

Aus dem Robert Koch-Institut
des Bundesgesundheitsamtes
Fachgebiet Chronisch-degenerative Viruserkrankungen
Leiter: Prof. Dr. H. Diring

REINIGUNG DES SCRAPIE-AGENS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde

Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
HORST HILMERT
aus Detmold
1984

Aus dem Robert Koch-Institut
des Bundesgesundheitsamtes
Fachgebiet Chronisch-degenerative Viruserkrankungen
Leiter: Prof.Dr. H. Diringer

REINIGUNG DES SCRAPIE-AGENS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde

Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Horst Hilmert
aus Detmold

1984

1. Referent: Prof.Dr. H.Diringer
2. Referent: Prof.Dr. E.-R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 06. September 1984

Diese Untersuchungen wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	1
2. PROBLEMSTELLUNG	11
3. ABKÜRZUNGEN	12
4. MATERIAL UND METHODEN	13
4.1 <u>Biologische Methodik</u>	13
4.1.1 Versuchstiere	13
4.1.2 Haltungsbedingungen	13
4.1.3 Scrapie-Agens	13
4.1.4 Aufarbeitung von Hirnsuspensionen zur Infektion	14
4.1.5 Aufarbeitung von Infektionsmaterial aus dem Reinigungsgang	14
4.1.6 Scrapie-Infektion der Versuchstiere	15
4.1.7 Diagnose der Scrapie-Erkrankung	16
4.1.8 Gehirnentnahme	16
4.1.9 Endpunkttitration	17
4.1.10 Titerbestimmung durch Inkubationszeitvergleiche	17
4.1.11 Sicherheitsmaßnahmen	19
4.2 <u>Chemische Analysen</u>	19
4.2.1 Proteinbestimmung mit Coomassie Brilliant Blue nach Bradford	19
4.2.2 Proteinbestimmung mit Folinreagenz	23
4.2.3 Photometrische Proteinbestimmung	25
4.2.4 RNA-Bestimmung mit Orcinol	26
4.2.5 DNA-Bestimmung mit Diphenylamin	28
4.2.6 Photometrische Nukleinsäurebestimmung	29

4.2.7	Schnellbestimmungen von RNA und DNA aus Gewebehomogenaten	31
4.3	<u>Reinigung von Scrapie-Infektiosität</u>	32
4.3.1	Herstellung eines enzymbehandelten Hirnextraktes	32
4.3.2	Isolation membrangebundener Scrapie- Infektiosität	34
4.3.3	Isolation der Scrapie-Infektiosität nach Detergenzbehandlung	34
4.3.4	Schnelle Isolation der Scrapie-Infektiosität aus detergenzgelöstem Hirnhomogenat	35
4.3.5	Röhrextraktion von Scrapie-Infektiosität nach Reinigung durch differentielle Zentrifugation	36
4.3.6	Sucrose Gradienten-Zentrifugation	37
4.3.6.1	Kombinierte Sedimentations- und Dichte- Zentrifugation	37
4.3.6.2	Sedimentations-Zentrifugation	38
4.3.7	CsCl Dichtegradienten-Zentrifugation	39
4.3.8	Chemikalien und Lösungen für die Isolierung von Scrapie-Agens aus Hamsterhirnen	40
4.4	<u>Gelelektrophorese</u>	42
4.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach U.K. Laemmli	42
4.4.2	Silberfärbung der Gele	42
4.4.3	Coomassie Brilliant Blue-Färbung der Gele	49
5.	ERGEBNISSE	50
5.1	<u>Reinigung von Scrapie-Infektiosität durch differentielle Zentrifugation</u>	50
5.1.1	Optimierung des Reinigungsschemas	52
5.1.1.1	Inaktivierung von Proteinase K durch PMSF ...	52
5.1.1.2	Einfluß von PMSF auf die Micrococcus- Nuclease	54

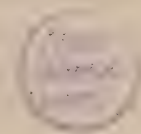
5.1.1.3	Sedimentation von Infektiosität mit einer Membranfraktion in Gegenwart und Abwesenheit von Detergenz	56
5.1.1.4	Ultraschallbehandlung und Zentrifugation in salzhaltigem Puffer	58
5.1.2	Berechnung der Teilchengröße im Sediment nach differentieller Zentrifugation	59
5.1.3	Verteilung der Scrapie-Infektiosität auf die verschiedenen Fraktionen der differentiellen Zentrifugation	60
5.1.4	Chemische Analysen und Reinigungsfaktoren ...	64
5.1.5	Stabilität der gereinigten Scrapie-Infektiosität in vitro	66
5.2	<u>Reinigung von Scrapie-Infektiosität durch Sedimentation in Sucrose- und CsCl-Gradienten</u>	67
5.2.1	Verhalten der Scrapie-Infektiosität in einem kombinierten Sedimentations- und Dichtelauf	67
5.2.2	Verhalten der Scrapie-Infektiosität in einem Sucrose-Sedimentationslauf	70
5.2.3	Verhalten der Scrapie-Infektiosität in einem CsCl-Gradienten	77
5.3	<u>Schnelle und effiziente Anreicherung von SAF-Protein</u>	81
6.	DISKUSSION	89
6.1	<u>Reinigung des Scrapie-Agens durch differentielle Zentrifugation</u>	89
6.2	<u>Isolation und Eigenschaften von Scrapie-assoziierten Fibrillen</u>	92
7.	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	99
8.	LITERATURVERZEICHNIS	103

1. EINLEITUNG

Scrapie ist eine chronisch-degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die in der Natur bei Schafen und Ziegen vorkommt (110). Sie wird von einem bisher unbekannten, unkonventionellen Erreger verursacht, der keine meßbare Immunreaktion des Wirtes stimuliert (94). Die Krankheit bezeichnet man in Deutschland auch als Wetz- oder Traberkrankheit, in Frankreich als Tremblante und in Irland als Rida (49). 1732 wurde Scrapie erstmals für England beschrieben (110).

Man vermutet, daß die Krankheit durch Merino Schafe verbreitet worden ist, die im 18. Jahrhundert aus Spanien in viele Länder Europas exportiert wurden. Durch englische Suffolk und Cheviot Zuchtschafe wurde Scrapie dann in zuvor freie Gebiete wie Kanada, USA, Neuseeland und Australien verschleppt (110).

Scrapie tritt heute in vielen Ländern auf, und Schafherden, in denen jedes zehnte Tier befallen ist, sind keine Seltenheit (19). Finanzielle Verluste entstehen für die Schafwirtschaft durch den Tod erkrankter Tiere oder Auslese vermeintlich erkrankter Schafe und vor allem durch die Erschwerung der Zucht wertvollere Rassen. Da es keinen Impfstoff gegen die Krankheit gibt und möglicherweise auch nie geben wird, ist die Resistenz gegen Scrapie eine Voraussetzung bei der Zuchtwahl, so daß das Selektionspotential stark eingeengt ist. Außerdem wird die Schafzucht durch den langen, inapparenten Verlauf einer bestehenden Infektion und der daraus folgenden Einschränkung des Welthandels mit Schafen beeinträchtigt (19).



Krankheitsbild

Ein natürlicher Infektionsweg bei der Scrapie-Erkrankung ist die vertikale Transmission. Es gilt als gesichert, daß der Erreger über die Plazenta auf das ungeborene Lamm übertragen werden kann (19). Darüber hinaus ist auch die horizontale Übertragung von Scrapie durch direkten Kontakt zwischen gesunden und infizierten Tieren möglich (7, 91). Ein weiteres Risiko einer Infektion besteht, wenn gesunde Schafe in einem zuvor mit kranken Tieren besetzten Gehege gehalten werden (7).

In der Regel manifestiert sich die Erkrankung bei Schafen zwischen dem zweiten und fünften Lebensjahr (110). Nach einer Inkubationszeit von vielen Monaten bis Jahren kommt es zum Auftreten erster klinischer Symptome und in wenigen Wochen immer zum Tod der Tiere (106). Die klinische Symptomatik läßt sich in drei Phasen einteilen. Erstes Anzeichen ist der Juckreiz, der durch Scheuern (= to scrape) und Knabbern am Fell beantwortet wird und der Erkrankung den Namen gab. Im weiteren Verlauf kann es bei einigen Tieren zu Übererregbarkeit und heftigem Zittern kommen, während andere Tiere schläfrig und apathisch erscheinen. Im Endstadium treten Bewegungsstörungen auf: der Gang der Tiere ist schwankend und unkoordiniert. Schließlich kommt es zu ausgeprägten Lähmungen der hinteren Extremitäten, so daß die Tiere nicht mehr stehen können (110).

Es ist bis heute nicht gelungen, den Erreger der Krankheit zu identifizieren oder genau zu charakterisieren, so daß in der Literatur der Begriff Agens für ihn verwendet wird. Übertragbarkeit (18) und Filtrierbarkeit (61) lassen ein sich selbst replizierendes System vermuten, das in der Größenordnung von Viren liegt.

Bei Transmissionsversuchen von infektiösem Hirnmaterial auf gesunde Schafe machte Sigurdsson 1954 folgende Beobachtungen:

1. Die Inkubationszeit betrug Monate bis Jahre.
2. Nach dem Auftreten klinischer Symptome setzte ein protrahierter Krankheitsverlauf ein, der immer zum Tode führte.
3. Die Infektion war auf eine Spezies und ein Organ beschränkt.

Krankheiten dieser Art werden unter dem Begriff der "langsamen" Virusinfektionen (slow virus infections, SVI) zusammengefasst. Diese von Sigurdsson aufgestellten Kriterien sind mit Ausnahme der Wirtsspezifität als Definition der SVI allgemein anerkannt (109).

Histologisch findet man während der Inkubationszeit keinerlei Veränderungen. Mit dem Eintritt klinischer Symptome kommt es dann ausschließlich im ZNS zu mikroskopisch nachweisbaren Veränderungen. Auffallend ist die progressive Degeneration der Neuronen. Es beginnt eine Vakuolisierung von Nervenzellen, ein Befund, der im Zusammenhang mit der langen Inkubationszeit die Diagnose der Scrapie-Erkrankung absichert.

Im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit schwellen die Vakuolen ballonartig an und führen zur Atrophie bzw. zum Platzen dieser Zellen und somit zu charakteristischer Plaquebildung im Gehirn. Damit geht eine Hypertrophie der Astrocyten einher, die vermutlich Folge der Nervenzellendegeneration ist. Für die Astrocyten ist ebenfalls die degenerative Vakuolisierung und Plaquebildung charakteristisch. Demyelinisierung sowie inflammatorische Prozesse, die auf eine Beteiligung des Immunsystems deuten, sind zu keinem Zeitpunkt nachweisbar. Erst im Endstadium der Erkrankung kann es vereinzelt zu perivaskulären Demyelinisierungen kom-

men, die dann als sekundäre Reaktion gewertet werden müssen (110).

Chronisch-degenerative Erkrankungen des ZNS

Experimentell wurde Scrapie zugänglich durch die Übertragung des Agens aus infiziertem Schafshirn auf die Maus durch Chandler 1961 (14). Die wesentlichen Vorteile des Mäusesystems liegen in der relativ kurzen Inkubationszeit, genetischer Einheitlichkeit der Tiere und der großen verfügbaren Individuenzahl. Inzwischen ist es gelungen, den Erreger auf Hamster zu übertragen (116). Hamster weisen von allen bekannten Tiersystemen die kürzeste Inkubationszeit auf und erreichen einen höheren Agenstiter im Gehirn als Mäuse (8, 63).

Im Jahre 1959 fand Hadlow eine auffallende Übereinstimmung der histopathologischen Veränderungen in Gehirnen von Scrapie-infizierten Schafen und Kuru Patienten (54). Inzwischen sind vier übertragbare Erkrankungen mit ähnlichen histologischen Befunden, einer langen Inkubationszeit und Fehlen von Entzündungszeichen, bekannt. Sie werden in der Gruppe der infektiösen spongiformen Encephalopathien zusammengefaßt, zu der außer Scrapie die Nerzencephalopathie (55), sowie beim Menschen Kuru und Morbus Creutzfeldt-Jakob gehören. Die Infektiosität der menschlichen Erkrankungen wurde durch die Übertragung auf Schimpansen und andere Primaten bewiesen (43, 47, 48). Aufgrund dieser Parallelen ist Scrapie Gegenstand umfangreicher Untersuchungen geworden, da diese Erkrankung als ein Modell für die menschlichen chronisch-degenerativen Erkrankungen angesehen wird.

Die Ätiologie der Alzheimer Krankheit ist noch unbekannt, aber aufgrund der Scrapie-ähnlichen Pathologie wird sie als

Kandidat für eine infektiöse chronisch-degenerative Erkrankung angesehen (21, 40). Einige Autoren vermuten sogar, daß neuronales Altern durch Scrapie-ähnliche Prozesse bewirkt und möglicherweise die senile Dementia durch ein infektiöses Agens hervorgerufen wird (35, 36, 114).

In den Gehirnen an Alzheimer Krankheit und seniler Dementia erkrankter Personen treten Amyloid-Ablagerungen auf (35, 47), wie man sie auch im Gehirn Scrapie-infizierter Mäuse bei bestimmten Wirt-Agens Kombinationen findet (114). Dabei hängt das Auftreten der cerebralen Amyloidosis sowohl vom Genotyp der Maus als auch der Agensgruppe ab (11, 39). Amyloide Plaques sind Ablagerungen von noch nicht genau definierter Zusammensetzung, die im Elektronenmikroskop fibrilläre Strukturen erkennen lassen, die der variablen Region leichter Immunglobulinketten ähneln (37, 51, 115). Röntgenstrukturanalysen lassen auf eine Faltblattstruktur schließen (50).

1981 wurden fibrilläre Strukturen in Hirnen Scrapie-infizierter Mäuse und Hamster gefunden (SAF, Scrapie assoziierte Fibrillen; 79, 80). Diese Fibrillen aus 2-4 Filamenten waren den im Amyloid beobachteten Strukturen ähnlich, traten aber unabhängig vom Vorhandensein amyloider Plaques auf und wurden nie in Kontrolltieren gefunden. Inzwischen sind SAF-Strukturen in Milzen Scrapie-infizierter Mäuse und Hamster und in Hirnen an Morbus Creutzfeldt-Jakob gestorbener Menschen nachgewiesen worden (81).

Scrapie in Maus und Hamster

Das Agens:

Wie man heute weiß, wird die Inkubationszeit in der Maus durch ein Gen, das in zwei Allelen vorliegt, kontrolliert.

Da seine natürliche Funktion unbekannt ist, wurde das Gen mit sinc (Scrapie incubation period) bezeichnet, die Allele wurden mit s für kurze (short) und p für verlängerte (prolonged) Inkubationszeit benannt. Heterozygote Tiere zeigen eine intermediäre Inkubationszeit (41).

Neuere Untersuchungen deuten auf zusätzliche Kontrolle der Inkubationszeit durch im Histokompatibilitätskomplex lokalisierte multiple Allele (70).

Bei den Scrapie-Agentien kann man im wesentlichen zwei Gruppen unterscheiden: ME7 mit relativ kurzer Inkubationszeit in sinc^{s7} Homozygoten, und 22A mit kurzer Inkubationszeit in sinc ^{p7} Homozygoten (41). Insgesamt wird der Zeitraum bis zum Auftreten erster klinischer Symptome durch fünf Faktoren kontrolliert:

- 1) Genotyp der Maus
- 2) Agens Gruppe
- 3) Art der Infektion
- 4) Injizierte Dosis
- 5) Alter der Tiere bzw. Immunstatus

Experimentell erfolgt die Infektion so, daß von manifest erkrankten Tieren das Gehirn isoliert und zu einer Suspension aufgearbeitet wird. In entsprechender Verdünnung werden solche Suspensionen intraperitoneal (i.p.) oder intracerebral (i.c.) injiziert. Dabei beträgt die Inkubationszeit in der Maus 4 Monate bei i.c. und 6 Monate bei i.p. Infektion (62), im Hamster 70 Tage bei i.c. und 100 Tage bei i.p. Infektion (63, 76).

Physiko-chemische Untersuchungen an Scrapie-Hirnsuspensionen haben ergeben, daß das Agens im Vergleich zu konventionellen

Viren eine extrem hohe Resistenz gegenüber den herkömmlichen Inaktivierungsmethoden aufweist (9, 34, 49, 83).

- 1) Eng membranassoziiert und hydrophob
(Plasmamembran und Endoplasmatisches Reticulum)
- 2) Targetgröße aus UV-Bestrahlung: $1,5 \times 10^5$ Dalton
- 3) Größe aus Filtrationsexperimenten: 30 nm - 50 nm
- 4) Hohe UV-Strahlendosis zur Inaktivierung erforderlich
- 5) Atypisches Inaktivierungsspektrum mit UV-Licht
- 6) Stabil gegen: feuchte (80°C) und trockene (160°C) Hitze,
pH 2 - 9, Salzlösungen, Detergentien, Alkohol, Formaldehyd.
- 7) Instabil gegen: Phenol, Chloroäthanol, Harnstoff,
Perjodat, Chloramin T.

Tabelle 1

Einige Eigenschaften des Chandler Stammes von Scrapie (unge-
reinigtes Material)

Die morphologische Struktur des Erregers ist bis jetzt noch unbekannt. Diese Tatsache und das ungewöhnliche Verhalten hat zu vielen Spekulationen über die Natur des Agens geführt: z.B. ein sich selbst replizierendes System ohne Nukleinsäure (3, 4), ein Polysaccharid (33), eine kleine Nukleinsäure mit einer Polysaccharidhülle (1), ein Nukleoproteinkomplex (72), membrangebundene DNA (77), ein unkonventionelles Virus (44, 58), ein aggregiertes konventionelles Virus mit ungewöhnlichen Eigenschaften (102), oder ein Viroid, ähnlich den pflanzenpathogenen RNA Viroiden (22).

1980 konnte Cho nachweisen, daß eine Proteinkomponente für die Scrapie-Infektiosität erforderlich ist und daß freie Scrapie-Nukleinsäure vermutlich nicht infektiös ist (15). Andere Versuche haben gezeigt, daß mit Differentialzentrifugation und Detergenzbehandlung eine partielle Reinigung der Infektiosität aus Gehirnhomogenat möglich ist (83, 84, 95-97).

Es existiert bis heute kein Gewebekultursystem, aus dem sich das Agens anreichern läßt. Niedrige Infektiositätstiter wurden in bis zu 150 Passagen von Gehirnzelllinien aus Mäusen nachgewiesen. Im Überstand wurde keine Infektiosität gefunden; demnach scheint sich der Erreger synchron mit der Zellteilung zu vermehren (17).

Schwierig gestaltet sich das Arbeiten mit Scrapie dadurch, daß es zur Zeit noch keine in vitro Testmethoden für das Agens gibt. Der Nachweis der Infektiosität bzw. Anreicherung kann gegenwärtig nur im Tiermodell geführt werden und ist in der Regel mit einem Zeitaufwand von mindestens 3 Monaten für ein Experiment zu bemessen.

Symptome:

Die ersten klinischen Anzeichen der Erkrankung bei Hamstern sind Nervosität und Ängstlichkeit. Mit Fortschreiten der Erkrankung werden sie übererregbar und wackeln rhythmisch mit dem Kopf. Im fortgeschrittenen Stadium tritt eine Kyphose auf, die Tiere können sich nur noch unkoordiniert bewegen, schließlich nicht mehr laufen und sterben dann (53, 75, 99). Ähnliche Symptome findet man bei Mäusen (30). Erkrankte Tiere halten oft den Schwanz in unnatürlichen Winkeln oder über dem Kopf gewölbt. Wird die kranke Maus am Schwanz hochgehalten, so umklammert sie mit den Hinterbeinen das Abdomen, während gesunde Mäuse die Beine spreizen.

Pathogenese:

Untersucht man bei der Maus nach einer i.p. oder i.c. Infektion die Verteilung des Agens in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, so findet man unabhängig vom Injektionsort das Agens zuerst in der Milz (31, 66, 85). Nach ca. 20 Tagen ist mit 10^{-6} der LD_{50} ($-\log_{10}/0,02$ g Gewebe) ein maximaler Titer in der Milz erreicht, der bis zum Exitus der Tiere konstant bleibt (62). Dem Titeranstieg in der Milz folgt eine lang-

same Verteilung des Agens über den Organismus, wobei bisher eine neuronale Ausbreitung angenommen wurde (67-69). 1984 gelang der Nachweis der Virämie (24).

Im Gehirn wird mit Einsetzen der klinischen Symptome nach ca. 100 Tagen bei Mäusen ein maximaler und konstanter Titer von $10^7 - 10^8$ der LD_{50} erreicht, der damit mindestens zehnmal so hoch ist, wie in irgendeinem anderen extraneuralen Gewebe (62). In Hamsterhirnen werden Titer von 10^8 (CLAC-Hamster) bis 10^9 der LD_{50} (Aura-Hamster) gefunden (64).

Immunologie:

Mehrere Experimente lassen vermuten, daß lymphoreticuläre Zellen als Targetzellen des Agens in Frage kommen (90). Entfernt man z.B. die Milz vor oder nach einer i.p. Infektion, so verlängert sich die Inkubationszeit um bis zu 20%. Bei einer i.c. Infektion hat Splenektomie keinen Einfluß auf die Inkubationszeit (38). Ähnliche Effekte wie die Splenektomie hat eine Steroidbehandlung, die u.a. die Proliferation immunkompetenter Zellen verhindert. Kurz vor oder nach einer i.p. Infektion gegeben, verlängert sich die Inkubationszeit um 14-20 Tage (89). Applikation von Dextransulfat 500 bewirkt sowohl vor als auch nach der Infektion eine Verlängerung der Inkubationszeit und kann sogar zum Überleben von Tieren führen (28, 29).

Diese Experimente waren so angelegt, daß die Immunreaktion des lymphoretikulären Systems unterdrückt bzw. ausgeschaltet worden war. Damit erreicht man bei Infektionskrankheiten normalerweise eine Verkürzung der Inkubationszeit. Bei der Scrapie-Erkrankung war das Gegenteil der Fall.

Um das Immunsystem zu aktivieren, wurde Mäusen kurz vor der i.p. Infektion Mitogen injiziert. Mit den ausgetesteten Mitogenen Phytohämagglutinin und Lipopolysaccharid konnte

jedoch die Inkubationszeit signifikant um 40 Tage verkürzt werden (20). Diese Behandlung, die normalerweise zu einer Verlängerung der Inkubationszeit führt, bewirkte bei der Scrapie-Erkrankung das Gegenteil.

Eine klassische Reaktion des Immunsystems in Form von Antikörpern konnte bisher nicht gefunden werden (60, 94). Die humorale Immunantwort von Scrapie-infizierten Mäusen gegen Schafserythrozyten ist nicht verändert (16).

Eine mögliche Erklärung für das Fehlen von Antikörpern könnte in der hydrophoben Natur des Agens liegen. Denkbar ist auch, daß nach einer Reinigung des Erregers eine Immunreaktion gefunden wird.

2. PROBLEMSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit ist, eine Methode zu entwickeln, mit der Scrapie-Infektiosität angereichert und gereinigt werden kann. Die gute Reproduzierbarkeit der Scrapie-Erkrankung in Nagern und der hohe Agentititer in Hamsterhirnen legten es nahe, mit Hamstern als Versuchstieren zu arbeiten. Als Maßeinheit der Reinigung sollte der Anstieg der spezifischen Infektiosität, bezogen auf Protein, RNA und DNA verwendet werden.

Die chemischen Analysen können mit Standardmethoden der Biochemie durchgeführt werden. Schwierigkeiten bereitet bei unkonventionellen, langsamen Viren der quantitative Nachweis der Infektiosität. Es werden keine cytopathischen Effekte und keine Reaktion des Immunsystems gefunden. Auch eine morphologische Struktur, sowie Scrapie-spezifische Nukleinsäure oder Protein waren zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt.

Der Titer kann nur im Tiermodell durch Endpunkttitration oder Inkubationszeitvergleiche ermittelt werden. Da die Bestimmung durch Inkubationszeitvergleiche weniger Tiere und Zeitaufwand erfordert, wurde diese Methode verwendet.

3. ABKÜRZUNGEN

Die Fraktionen des Reinigungsganges wurden nach Zentrifugationen mit P für Sediment (pellet) und S für Oberstand (supernatant) bezeichnet und mit Indizes versehen, die ein Tausendstel der g-Zahl darstellen.

Aura-Hamster:	syrischer Goldhamster
bre:	Hirnäquivalent (<u>b</u> rain <u>e</u> quivalent)
BSA:	<u>b</u> ovines (Rinder) <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
CLAC-Hamster:	Goldhamster Inzuchtstamm (<u>C</u> linical <u>L</u> aboratory <u>A</u> nimal <u>C</u> entre)
cpm:	Impulse (<u>c</u> ounts) <u>p</u> ro <u>M</u> inute
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
g:	Erdbeschleunigung oder Gramm
LD ₅₀ :	<u>l</u> ethal <u>d</u> ose ₅₀
M:	Molarität
M _r :	relative Masse
N:	Normalität
PBS ⁻ :	phosphatgepufferte Saline ohne Calcium und Magnesium
PMSF:	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm:	Umdrehungen (<u>r</u> ounds) <u>p</u> ro <u>M</u> inute
s:	Sedimentations-Koeffizient
SAF:	<u>S</u> crapie- <u>a</u> ssoziierte <u>F</u> ibrille
SDS-PAGE:	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS:	Tris gepufferte Saline
Tris:	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
Z 3-14:	Zwittergent 3-14 (N-tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat)
ZNS:	Zentralnervensystem

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Biologische Methodik

4.1.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit zwei Hamsterstämmen, dem syrischen Goldhamster (*Mesocricetus auratus*), im folgenden Aura-Hamster genannt, und dem Goldhamster Inzuchtstamm CLAC "apricot" durchgeführt. Der Inzuchtstamm hat seinen Ursprung im Clinical Laboratory Animal Centre des Medical Research Council (Großbritannien) und wird in der vorliegenden Arbeit als CLAC-Hamster bezeichnet. Unser CLAC-Stamm wurde von Dr. R.Friis, Institut für Virologie, Universität Gießen, übernommen und befindet sich etwa in der 60.Generation.

4.1.2 Haltungsbedingungen

Die Hamster wurden einzeln in Makrolonkäfigen (Typ I, Bayer) unter standardisierten Bedingungen gehalten. Temperatur 22°C, 12 Stunden Licht-Dunkelwechsel, Wasser und Altromin Zuchtfutter Nr. 1314 ad libitum.

4.1.3 Scrapie-Agens

In allen Experimenten wurde der an Hamster adaptierte Scrapie-Stamm 263 K verwendet. Wir erhielten das Agens von Dr. Kimberlin, ARC and MRC Neuropathogenesis Unit, West Mains Road, Edinburgh EH9 3JF, Großbritannien, nach der 5. i.c. Passage in Goldhamstern als 10^{-2} Suspension in physiologischer Kochsalzlösung.

Der Stamm wurde im Robert Koch-Institut auf CLAC- und Aura-Hamster übertragen. Ausgangsmaterial, was wir für unsere Versuche verwendet haben, stammt aus der 1.Berlin-Passage.

4.1.4 Aufarbeitung von Hirnsuspensionen zur Infektion

Die Infektionslösung bestand aus einer Suspension von Hirnen manifest Scrapie-erkrankter Hamster: ein gefrorenes Gehirn (Gewicht ca. 1 g) wurde nach Auftauen mit der Schere zerkleinert und mit 9 ml gepufferter, physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Das Homogenisieren des Materials fand mit einem Ultraschallgerät (Modell w 184 f, Heat Systems-Ultrasonics Inc., Plainview, N.Y., USA) im Eisbad unter der Laminar Flow statt.

Diese Suspension wurde 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert (Heraeus Christ, Minifuge 2) und der Überstand = 10^{-1} Homogenat in 0,2 ml Portionen bei -20°C eingefroren.

Für die Infektion wurde eine Probe mit 1,8 ml physiologischer Kochsalzlösung mit Antibiotika auf eine 10^{-2} Verdünnung gebracht und unmittelbar vor der Titration mit Ultraschall behandelt.

4.1.5 Aufarbeitung von Infektionsmaterial aus dem Reinigungsgang

Vor Beginn jedes Experiments wurden die benötigten Eppendorf-Pipetten geeicht. Von jeder zu titrierenden Fraktion aus dem Trennungsgang wurde ein Fünfhundertstel entnommen und in ein verschließbares 20 ml Glasgefäß gegeben. Alle Proben wurden mit phosphatgepufferter Saline ohne Calcium und Magnesium (PBS^-) mit Antibiotika auf 10 ml aufgefüllt

und im Kühlschrank gesammelt. Die injizierte Probe von 50 µl entspricht einer 10^{-2} Verdünnung. Höhere Verdünnungsstufen wurden aus einer Zwischenverdünnung mit PBS⁻/Antibiotika pipettiert und analog behandelt.

Unmittelbar vor der Titration erhielten alle Proben eine Ultraschallbehandlung. Bei Beschallung mehrerer Proben wurden zur Vermeidung von Kontaminationen folgende Maßnahmen getroffen: Abwischen des Ultraschallstabes mit Desinfektionslösung (1% SDS/0,1 M NaOH), Abwischen mit 70% Isopropanol, Abflammen.

4.1.6 Scrapie-Infektion der Versuchstiere

Die 1-3 Monate alten Hamster wurden mit 0,25 ml Betäubungslösung pro 100 g Körpergewicht i.p. betäubt. Die Mischspritze enthielt 2 Teile Rompun (Bayer AG, Leverkusen) und 3 Teile Ketanest (Parke-Davis, München), pro ml: 8 mg Rompun und 30 mg Ketanest. Die Injektion wurde in den unteren linken Quadranten des Abdomens gesetzt, weil dort die Wahrscheinlichkeit, lebenswichtige Organe zu verletzen, gering ist.

Nach 15 Minuten wurde bei den narkotisierten Tieren die Injektionsstelle mit 70% Isopropanol desinfiziert und der Kopf kurz hinter den Ohren festgehalten. (Kennzeichen fester Narkose sind: hervorgetretene Augen, keine Reaktion auf Kneifen.) Mit schräg angeschliffenen, 0,5 mm langen Spezialkanülen wurde die Schädeldecke im Bereich des Mittelhirns durchstoßen und 50 µl Infektionslösung injiziert. Jeweils nach drei Injektionen verwendete man eine neue Kanüle. Nach der Inokulation bekamen die Tiere eine Lage Zellstoff in den Käfig.

4.1.7 Diagnose der Scrapie-Erkrankung

Zwei Monate nach der Infektion wurden die Hamster zweimal in der Woche auf Krankheitssymptome diagnostiziert und dabei in vier Kategorien eingeteilt:.

- 1) ohne Befund: keine Krankheitssymptome
- 2) Verdacht: die Tiere erscheinen schreckhaft und übernervös bei Geräuschen und plötzlichen Bewegungen. Sie bauen kein Nest mehr.
- 3) Scrapie-Verdacht: es treten unkoordinierte Bewegungen und rhythmisches Wackeln des Kopfes auf.
- 4) Scrapie: die Versuchstiere sind nicht mehr in der Lage, sich längere Zeit aufzurichten. Dieses Stadium tritt 12-16 Tage nach den ersten verdächtigen Verhaltensänderungen auf.

4.1.8. Gehirnentnahme

Sobald eindeutig Scrapie diagnostiziert war, wurden die Hamster mit CO₂ oder Äther getötet. Anschließend wurden die Gehirne entnommen, in Portionen à 5 in verschließbare Glasgefäße gegeben und bei -20°C eingefroren.

Zur Gehirnentnahme wurde der Kopf zwischen den Condylen des Hinterhauptes und den ersten Halswirbeln vom Rumpf abgelöst. Dann wurden Haut und Muskulatur vom Schädel abpräpariert, indem man einen Medianschnitt von der Nase zum Hinterhauptsloch und einen zweiten, senkrecht darauf stehenden Schnitt in der Scheitelregion führt und die vier Hautzipfel abpräpariert. Nachdem die Schädelkapsel freigelegt war, wurde sie mit einer Schere ringsherum aufgeschnitten. Man geht dabei vom Hinterhauptsloch aus und führt beiderseits den Schnitt nach vorn, dicht über dem Auge hinweg. Beide Schnitte wurden vorne durch einen transversalen Schnitt verbunden. Danach

konnte man die Schädeldecke abnehmen und die Hirnhaut entfernen. Das nun freiliegende Gehirn konnte nach Durchtrennen der Nerven vorsichtig mit einem Spatel aus der Schädelbasis herausgehoben werden.

4.1.9 Endpunkttitration

Zur Ermittlung des Infektionstiters wurden infektiöse Hirnhomogenate in Zehnerstufen verdünnt und in Gruppen von 3-5 Hamstern i.c. inokuliert. Im Zeitraum von 2-7 Monaten nach der Infektion wurde die Anzahl der Scrapie-infizierten Tiere je Gruppe ermittelt. Hamster, die nach 10 Monaten noch keine Krankheitssymptome aufweisen, wertet man als nicht infiziert.

Der Titer wurde nach dem Verfahren von Spearman und Kärber berechnet (5).

4.1.10 Titerbestimmung durch Inkubationszeitvergleiche

Mehrere Autoren haben gezeigt, daß sich mit fallender Agensdosis die Inkubationszeit verlängert (65, 99). Dadurch besteht die Möglichkeit, aus dem Inkubationszeitmittelwert einer Gruppe von 3-5 Hamstern die mit geeigneten Verdünnungen aufgearbeiteter Fraktionen infiziert wurden, den Titer anhand der Dosis-Wirkungskurve zu bestimmen. Die Inkubationszeit ist die Zeitdifferenz zwischen dem Tag der Infektion und dem Tag der Scrapie-Diagnose. Diese Methode der Titerbestimmung ist schneller und kann mit weniger Tieren durchgeführt werden als die Endpunkttitration.

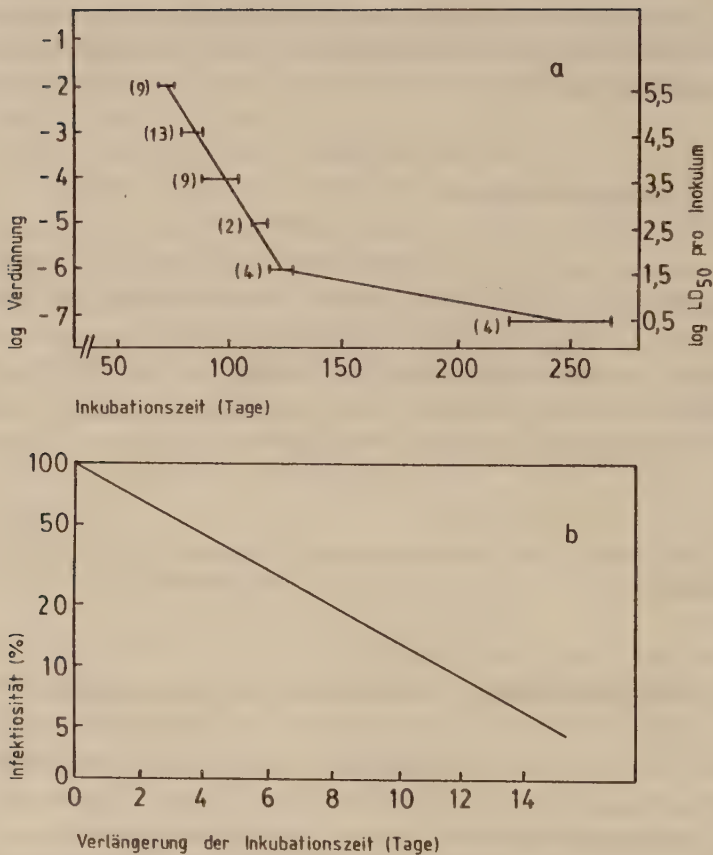


Abbildung 1

- a) Inkubationszeit in Tagen (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von n Tieren) in Abhängigkeit von der Verdünnung einer Hirnsuspension aus klinisch erkrankten Hamstern und LD₅₀ dieser Verdünnungen.
- b) Abhängigkeit der Inkubationszeitverlängerung vom relativen Infektiositätsgehalt von 10^{-2} - 10^{-6} Verdünnungen einer Hirnsuspension aus klinisch erkrankten Hamstern.

Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, verlängert sich die Inkubationszeit mit steigender Verdünnung der Hirnsuspensionen. Diese Beziehung ist halblogarithmisch linear bis zu einer 10^{-6} Verdünnung des Infektionsmaterials. Die Titerreduktion um eine Zehnerstufe führt zu einer Inkubationszeitverlängerung von ca. 12 Tagen.

4.1.11 Sicherheitsmaßnahmen (10)

Alle Arbeitsvorgänge wurden steril an einer Sicherheitsworkbank der Klasse II durchgeführt (Laminar Flow, Bio Gard Hood, The Baker Company, Sanford, Maine, USA). Zur Oberflächendesinfektion diente eine Lösung von 1% SDS (Serva Nr. 20760) und 0,3% NaOH (Merck Nr. 6462). Infektiöses Material wurde in Stahleimern gesammelt und autoklaviert.

4.2 Chemische Analysen

4.2.1 Proteinbestimmung mit Coomassie Brilliant Blue nach Bradford (6)

Standardlösung (1 mg Protein/ml):

50 mg Rinderserumalbumin (Behringwerke AG, Marburg) wurden in 50 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst, anschließend in Portionen à 5 ml abgefüllt und bei -20°C eingefroren. In Gebrauch befindliche Proben können 2 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Herstellung der Reagenz-Stammlösung:

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva Nr. 17524) wurden in 50 ml Methanol (Merck Nr. 6009) gelöst. Im Eisbad wurden zu 100 ml destilliertem Wasser 100 ml 85%-ige Phosphorsäure (Merck Nr. 573) gegeben. Nach Abkühlen wurde diese

Phosphorsäurelösung mit der Farblösung vereinigt und in einer Glasflasche im Kühlschrank aufbewahrt.

Reagenzlösung:

Vor Gebrauch mußte die Stammlösung mit destilliertem Wasser 1:4 verdünnt werden. Die Gebrauchslösung wurde in Glasflaschen bis zu 2 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt.

Eichkurve:

- a) Für normale Bestimmungen wurden 10-100 μ l Standardlösung in Reagenzgläsern mit destilliertem Wasser auf 100 μ l aufgefüllt und mit 5 ml Reagenzlösung versehen. Nach Mischen konnte 5 Minuten bis 1 Stunde später die Extinktion bei 595 nm gegen einen Leerwert (100 μ l dest. Wasser + 5 ml Reagenzlösung) gemessen werden (Beckman Model 25 Spectrophotometer) (siehe Abb. 2a).
- b) Mikrobestimmung: 10-100 μ l einer 1:10 verdünnten Standardlösung wurden mit dest. Wasser auf 100 μ l aufgefüllt und mit 1 ml Reagenzlösung versehen. Die Messung erfolgte gegen einen entsprechenden Leerwert (siehe Abb. 2b).

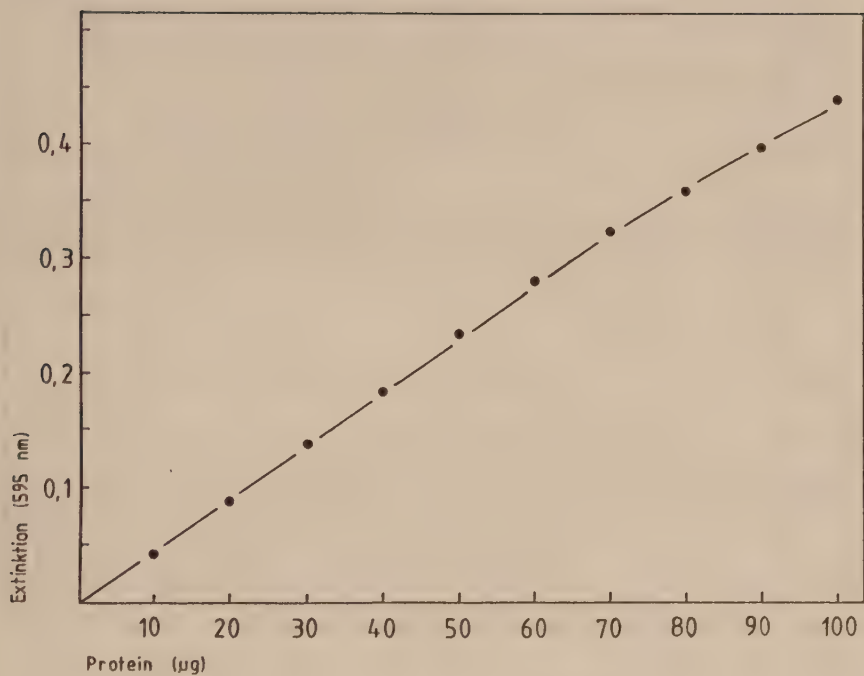


Abbildung 2a

Proteinbestimmung nach Bradford (Mittelwerte aus 3 Bestimmungen)

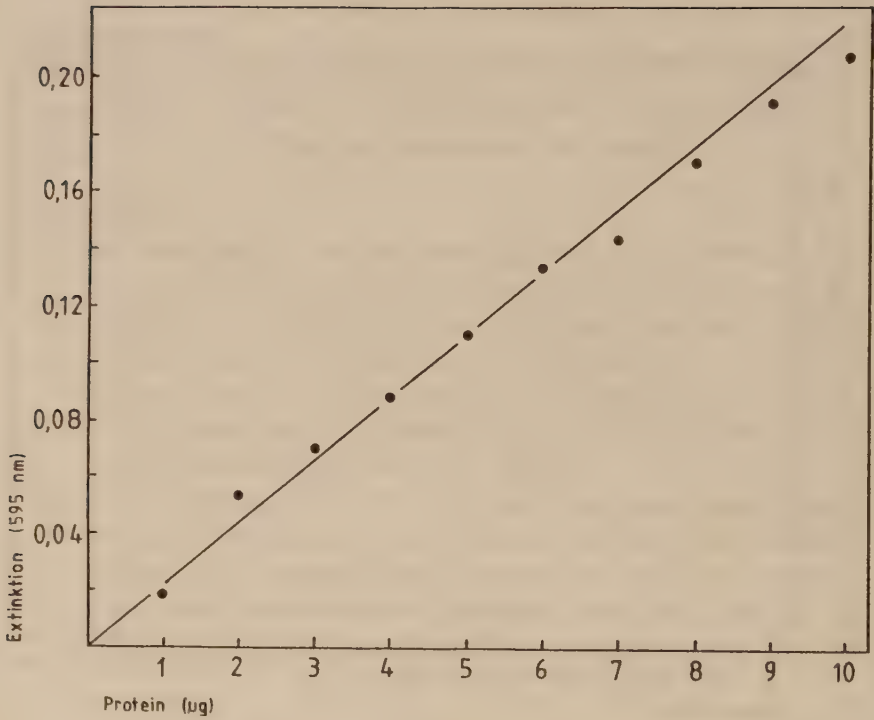


Abbildung 2b

Proteinbestimmung nach Bradford, Mikrobestimmung (Mittelwerte aus 2 Bestimmungen)

4.2.2 Proteinbestimmung mit Folinreagenz (73, 108)

Lösungen:

- A) 2% Na_2CO_3 (Merck Nr. 6391) in 0,1 N NaOH (Merck Nr. 6462), in Plastikflaschen aufbewahrt.
- B) 0,5% CuSO_4 (Merck Nr. 2790) in 1% Natriumcitrat (Merck Nr. 6448), im Kühlschrank gelagert
- C) Alkalische Kupferlösung: 1 Teil Lösung B + 50 Teile Lösung A (1 Tag haltbar)
- D) Karbonat-Kupferlösung, Wie Lösung C, nur ohne Natronlauge
- E) Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Merck Nr. 9001), verdünnt auf 1 N

a) Bestimmung löslicher Proteine

Eichkurve:

1 mg Rinderserumalbumin wurde in 1 ml dest. Wasser mit 0,2% SDS gelöst. 5-100 μl dieser Lösung wurden in Reagenzgläser pipettiert, mit 0,2% SDS auf 100 μl aufgefüllt und mit 1 ml Lösung C versetzt. (Nullwert: 100 μl 0,2% SDS + 1 ml Lösung C.) Nach Mischen mußten die Proben 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen (Ablauf der Protein-Kupfer-Reaktion). Dann wurden 100 μl Lösung E dazu pipettiert, innerhalb von 1-2 Sekunden gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. (Reduktion des Folin-Reagenz durch das kupferbehandelte Protein.) Die Messung der Extinktion erfolgte bei 700 nm.

b) Bestimmung unlöslicher Proteine (Säurepräzipitate)

Eichkurve:

1 mg Rinderserumalbumin wurde in 1 ml 1 N NaOH gelöst. 5-100 μl dieser Lösung wurden in Reagenzgläser pipettiert, mit 1 N NaOH auf 100 μl aufgefüllt und mit 1 ml Lösung D versetzt. (Nullwert: 100 μl 1 N NaOH + 1 ml Lösung D.)

Die weitere Behandlung erfolgte wie bei der Bestimmung löslicher Proteine.

c) Proteinbestimmung im extrahierten Sediment (siehe 4.3.5)
Das Sediment P (E) aus 5 Hamsterhirnen wurde mit 1,5 ml HClO_4 5% versetzt und 30 Minuten bei 90°C gehalten. Nach Eppendorf-Zentrifugation wurde der Überstand für die Nukleinsäurebestimmung verwendet, das Sediment für die Proteinbestimmung.

Das Präzipitat wurde mit 30 μl 1 N NaOH und Ultraschall gelöst und 30 Minuten bei 100°C gekocht. Nach Eppendorf-Zentrifugation wurden 100 μl Überstand mit 1 ml Lösung D gemischt. Die weitere Behandlung erfolgte wie bei der Anfertigung der Eichkurven.

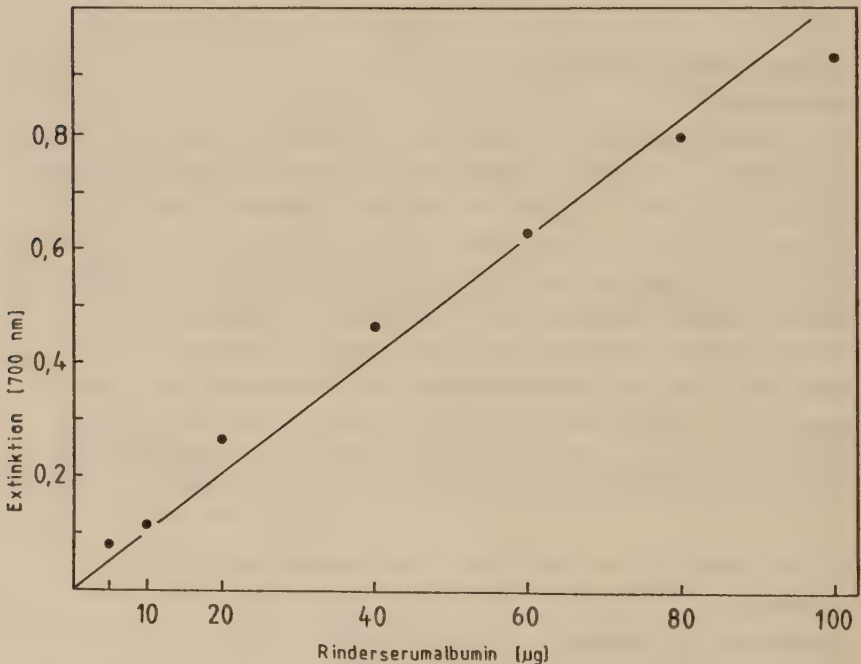


Abbildung 3

Proteinbestimmung mit Folinreagenz. Die Werte sind für die Bestimmungen löslicher und unlöslicher Proteine identisch. (Mittelwerte aus 2 Bestimmungen)

4.2.3 Photometrische Proteinbestimmung

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford bildet das Detergenz Z 3-14 mit dem Proteinreagenz einen blauen Farbstoff, der die Bestimmung stört. Daher wurde der Proteingehalt detergenzhaltiger Fraktionen photometrisch bei 225 und 230 nm gemessen. Bei diesen Wellenlängen ist die Absorption von Z 3-14 gering und eventuell störende Nukleinsäuren weisen ein Absorptionsminimum auf. Da unterschiedliche Proteine unterschiedliche Absorptionsspektren haben können, kann aus der UV-Proteinbestimmung nur auf ungefähre Werte geschlossen werden.

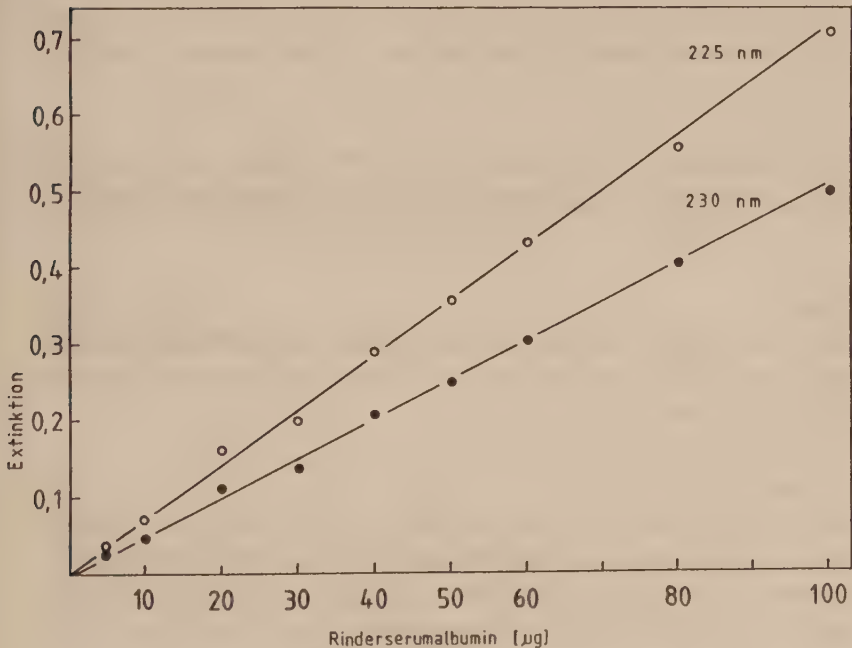


Abbildung 4

Photometrische Bestimmung von Rinderserumalbumin bei 225 und 230 nm.

Die Absorption von gereinigten Fraktionen des Aufarbeitungsganges wurde nach Abzentrifugieren unlöslicher Bestandteile in einer Eppendorf-Zentrifuge gegen dest. Wasser gemessen.

Eichkurve:

5-100 μ l Standardlösung (siehe 4.2.1) wurden mit dest. Wasser auf 1 ml aufgefüllt und gegen dest. Wasser bei 225 und 230 nm gemessen (siehe Abb. 4).

4.2.4 RNA-Bestimmung mit Orcinol (78, 105)

Die Methode basiert auf der Umwandlung von Pentose zu Furfural in Gegenwart heißer Säure. Die Reaktion des Furfurals führt zu einer grünen Farbe, die bei 670 nm gemessen wird.

Standard:

10 mg Hefe-RNA (Boehringer Nr. 109215) wurden in 10 ml 5% HClO_4 (Merck Nr. 518) gelöst und in 1 ml Portionen eingefroren.

Reagenz:

100 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Merck Nr. 3943) und 100 mg Orcinol (Merck Nr. 7093) wurden in 100 ml konzentrierter HCl (Merck Nr. 317) gelöst.

Eichkurve:

20-200 μ l Standard-RNA wurden mit 5% HClO_4 auf 1 ml aufgefüllt. (Leerwert 1 ml 5% HClO_4). Dazu wurde 1 ml Reagenz gegeben, gemischt und das Reagenzglas mit einer Murmel bedeckt. Nach 45 Minuten im kochenden Wasserbad wurde bei 670 nm die Extinktion gemessen.

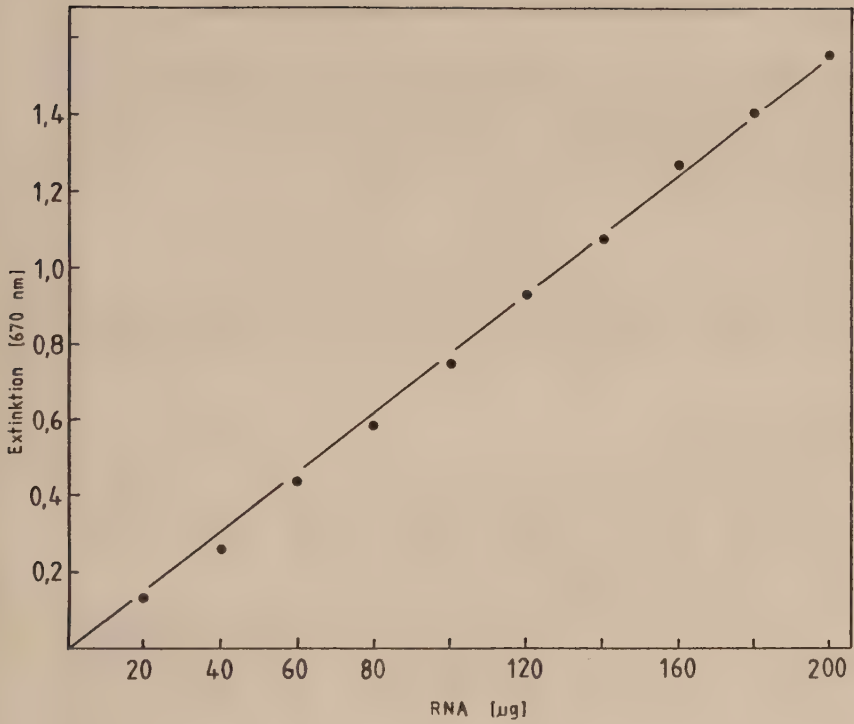


Abbildung 5

RNA-Bestimmung mit Orcinol (Mittelwert aus 2 Bestimmungen)

4.2.5 DNA-Bestimmung mit Diphenylamin (12, 105)

Die Desoxypentose der DNA bildet mit Diphenylamin in einem Essigsäure-Schwefelsäure-Gemisch bei 100°C eine blaue Farbe. Diese Reaktion findet nach Zusatz von Acetaldehyd bereits bei 30°C statt.

Standard:

10 mg Kalbsthymus-DNA (Fluka Nr. 83370) wurden in 10 ml 5% HClO_4 (Merck Nr. 518) gelöst und in 1 ml Portionen eingefroren.

Reagenz:

- 1) 1,5 g Diphenylamin (Merck Nr. 3086) wurden in 100 ml Eisessig (Merck Nr. 56) gelöst und mit 1,5 ml konzentrierter H_2SO_4 (Merck Nr. 732) versetzt. Die Aufbewahrung erfolgte im Dunkeln.
- 2) Eine Lösung von 160 mg Acetaldehyd (Merck Nr. 800004) in 10 ml dest. Wasser wurde hergestellt und bei -20°C gelagert. (Herstellung unter dem Abzug: 5 ml Wasser wurden mit dem Gefäß ausgewogen, 200 µl (160 mg) Acetaldehyd zugesetzt und nachgewogen. Anschließend wurde die Lösung so mit dest. Wasser verdünnt, daß die erforderliche Konzentration erreicht wurde.)
- 3) Kurz vor Gebrauch wurden zu 10 ml Diphenylaminlösung 50 µl Acetaldehyd (2) gegeben.

Eichkurve:

5-100 µl Standard-DNA wurden mit 5% HClO_4 auf 500 µl aufgefüllt und 15 Minuten bei 70°C im Wasserbad gehalten. (Leerwert 500 µl 5% HClO_4)

Nach Abkühlen wurde 1 ml Reagenz (3) dazu pipettiert und gemischt. Die Reagenzgläser wurden mit Parafilm verschlossen und 20 Stunden bei 30°C gehalten. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 600 nm.

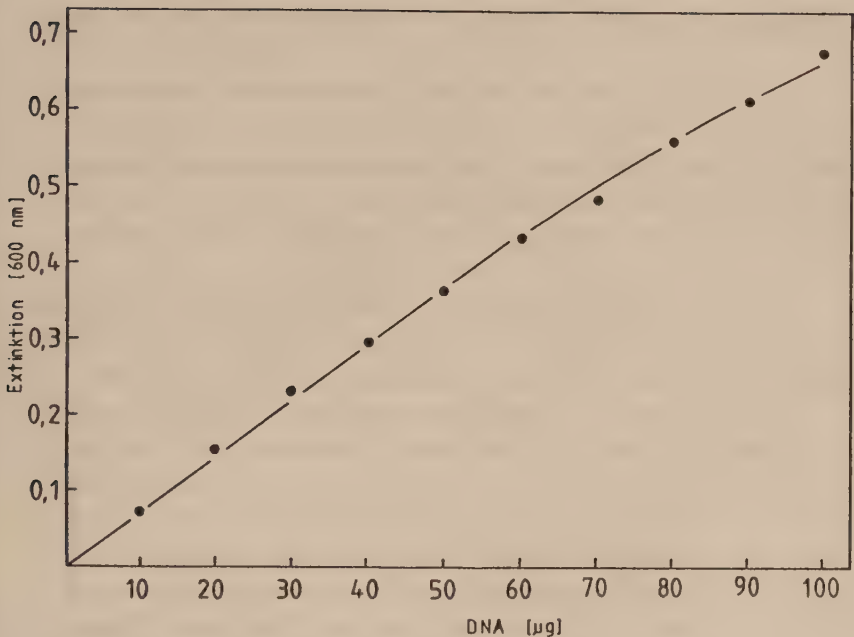


Abbildung 6

DNA-Bestimmung mit Diphenylamin (Mittelwert aus 3 Bestimmungen)

4.2.6 Photometrische Nukleinsäurebestimmung (86)

Nukleinsäuren können aufgrund der starken UV-Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen photometrisch bestimmt werden. Diese Methode erlaubt keine gesonderte Bestimmung von DNA und RNA, sofern diese nicht vorher getrennt worden sind und kann durch die Absorption von Proteinen bei 260 nm gestört werden. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt jedoch bei 280 nm, so daß man aus dem Verhältnis 260/280 nm ungefähr abschätzen kann, wie das Verhältnis Nukleinsäure/Protein ist. Reine, unhydrolysierte DNA oder RNA hat ein Verhältnis OD_{260}/OD_{280} von 2.

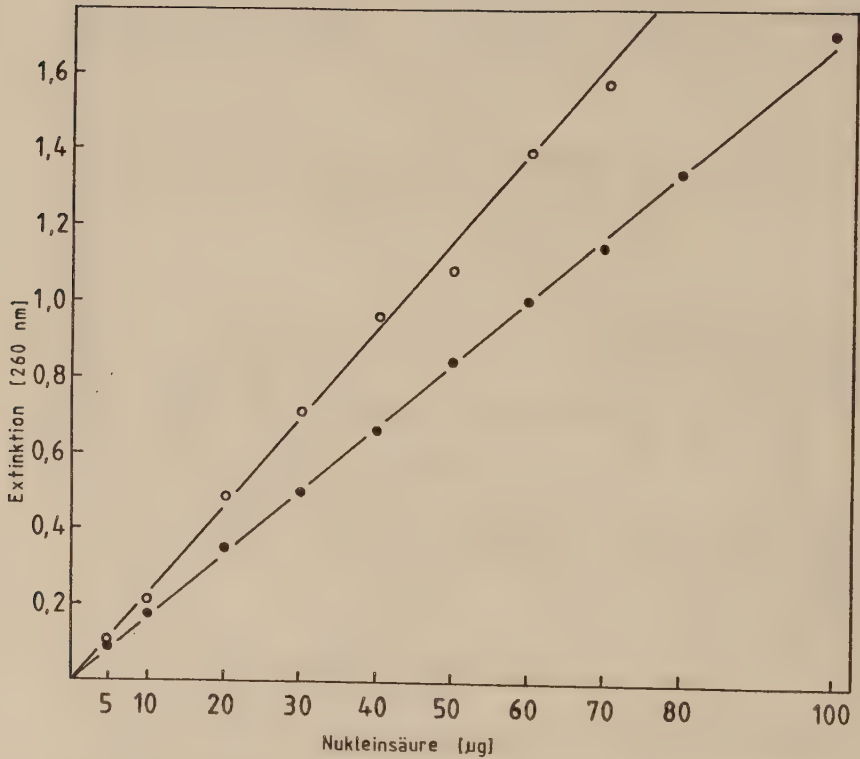


Abbildung 7

Photometrische Nukleinsäurebestimmung bei 260 nm.

● DNA ○ RNA

Eichkurven:

5-70 µl RNA- bzw. 5-100 µl DNA-Standardlösung (siehe 4.2.4 und 4.2.5) wurden bei 260 nm gemessen.

Nukleinsäurebestimmungen von Fraktionen des Reinigungsganges:

a) Gemeinsame UV-Bestimmung von RNA und DNA

Die zu untersuchende Probe wurde mindestens 15 Minuten bei 90°C in 5% HClO_4 (Merck Nr. 518) hydrolysiert. Nach 15 Minuten Zentrifugation in der Eppendorf-Zentrifuge wurden im Überstand OD_{260} und OD_{280} gemessen.

b) Getrennte UV-Bestimmung von RNA und DNA

1. 900 μl der zu untersuchenden Probe wurden mit 100 μl 3 N NaOH (Merck Nr. 6462) auf einen Gehalt von 0,3 N NaOH gebracht und in ein Eppendorf-Gefäß überführt.
2. Um die RNA abzubauen, wurde nach Mischen 2 Stunden bei 37°C inkubiert.
3. Bei 0°C Zugabe von 150 μl 40% (6N) HClO_4 (Merck Nr. 518). (50 μl um die NaOH zu neutralisieren und 100 μl um eine Endkonzentration von 4% HClO_4 zu erreichen). Nach 15 Minuten wurde die Probe in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert (15 Minuten).
4. Bestimmung von OD_{260} und OD_{280} im Überstand, um den RNA-Gehalt zu berechnen. Das Sediment wurde 1 mal mit 1 ml 4% HClO_4 gewaschen und in 1 ml 4% HClO_4 aufgenommen.
5. Im Sediment wurde 15 Minuten bei 90°C die DNA hydrolysiert.
6. Nach 15 Minuten Eppendorf-Zentrifugation konnten im Überstand OD_{260} und OD_{280} zur Berechnung des DNA-Gehaltes bestimmt werden.

4.2.7 Schnellbestimmung von RNA und DNA aus Gewebe-homogenaten (105)

1. Im Eisbad Zugabe von dem gleichen Volumen an 10%-iger HClO_4 (Merck Nr. 528). Dabei fallen Proteine, Nukleinsäuren und Lipide aus.

2. Nach 10 Minuten 3000 g Zentrifugation (Heraeus Christ, Minifuge 2) wurde der Überstand abdekantiert, das Sediment 1 mal mit 5 ml 5%-iger HClO_4 gewaschen und abzentrifugiert.
3. Um Lipide zu extrahieren, mußte das Sediment 2 mal mit 95%-igem Äthanol gewaschen werden.
4. Der Rückstand wurde mit 3,5 ml 5% Perchlorsäure aufgewirbelt und unter gelegentlichem Schütteln 15 Minuten im Wasserbad bei 90°C gehalten. Dabei hydrolysieren alle Nukleinsäuren und gehen in Lösung.
5. Nach Abkühlen wurde von den unlöslichen Proteinen abzentrifugiert (10 Minuten, 3000 g) und der Überstand für die Orcinol-Bestimmung von RNA (2 mal 1 ml) und die Diphenylaminbestimmung von DNA (2 mal 0,5 ml) verwendet.

Bei geringem DNA/RNA-Gehalt wurden nur 4. und 5. durchgeführt.

4.3 Reinigung von Scrapie-Infektiosität

4.3.1 Herstellung eines enzymbehandelten Hirnextraktes

Eine schematische Darstellung des Reinigungsprozesses erfolgt im Ergebnisteil unter Punkt 5.1.

Fünf eingefrorene Hamsterhirne wurden aufgetaut, in eine vorgewogene 100 ml Glasflasche überführt und gewogen. Die Hirne wurden mit 45 ml TBS (Tris gepufferte Saline) bzw. PBS^- (Phosphat gepufferte Saline ohne Calcium und Magnesium), pH 7,4 und 10 μg Proteinase K/ml (Serva Nr. 33752) versetzt und mit einem Ultra-Turrax Gerät (Janke & Kunkel, Ika-Werk) homogenisiert. Das Homogenisieren erfolgte im Eisbad für 3×12 Sekunden, mit ebenso langen Pausen, unter der Laminar Flow. Der Raum zwischen Homogenisatorstab und

Flaschenhals wurde mit Watte abgedichtet. Der beim Homogenisieren entstandene Schaum wurde durch Schütteln unter Zugabe von 3 Tropfen Oktanol entfernt.

Das so erhaltene Hirnhomogenat wurde in 50 ml Plastikröhrchen (Falcon Nr. 2070 F) überführt und in der Minifuge 2 (Heraeus Christ, Berlin) 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Der Überstand (I) wurde durch Glaswolle in einen Erlenmeyerkolben filtriert, das Sediment mit 25 ml TBS bzw. PBS⁻, pH 7,4 und 10 µg Proteinase K/ml durch Schütteln aufgeschlämmt und nochmals (wie oben) zentrifugiert. Der Überstand (II) wurde durch Glaswolle filtriert und mit dem Überstand (I) zu 70-75 ml Überstand S₃ vereinigt. Das Sediment P₃ wurde verworfen.

Der Überstand S₃ wurde 90 Minuten bei 37°C inkubiert, um die Proteinhydrolyse durch Proteinase K ablaufen zu lassen. Anschließend wurden 75 µl PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) 0,05 M dazu pipettiert und 15 Minuten einwirken gelassen, um die Proteinase zu inaktivieren.

Dann wurden pro ml Überstand S₃ gegeben:

1. 1,5 mg Tris (Merck Nr. 8382), um den pH-Wert auf 8,2-8,4 zu erhöhen und damit für die Aktivität der Micrococcus-Nuclease zu optimieren.
2. 5 µl 0,5 M CaCl₂ · 2 H₂O (Merck Nr. 2382), um die Nuclease zu aktivieren.
3. 1 µg Micrococcus-Nuclease (Boehringer, Mannheim Nr. 107921), um wirtseigene DNA und RNA zu hydrolysieren.

Der Überstand wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und nach Abschluß der Enzymbehandlung als S_{3enz} bezeichnet.

4.3.2 Isolation membrangebundener Scrapie-Infektiosität

Der enzymbehandelte Hirnextrakt wurde in 50 ml Plastikröhrchen überführt, für 5 Minuten bei 3000 g in der Minifuge zentrifugiert und das kleine Sediment verworfen. Der Überstand wurde in drei 25 ml Polycarbonatröhrchen (Beckman Nr. 340382) gefüllt, austariert und mit Norylkappen (Beckman Nr. 335259) verschlossen. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 40 Minuten bei 22000 g (16000 rpm), 20°C in einem Beckman R 30 Rotor.

Danach wurden die Überstände verworfen und die Sedimente (P₂₂) weiterverarbeitet.

4.3.3 Isolation der Scrapie-Infektiosität nach Detergenzbehandlung

Die sedimentierte Scrapie-Infektiosität (siehe 4.3.2) wurde mit Hilfe von Ultraschall in 5-10 ml TBS oder PBS⁻ mit 1% Sarkosyl aufgeschlämmt und in einem Polycarbonatröhrchen vereinigt. Anschließend erfolgte für 10-15 Sekunden eine Behandlung mit Ultraschall, die mit ebenso langen Pausen dreimal wiederholt wurde, um das Sediment vollständig zu lösen. Nach Zugabe von 25 µg Proteinase K wurde mit gepufferter Saline und 1% Sarkosyl auf 25 ml aufgefüllt und 20 Minuten bei 22000 g zentrifugiert. (Bedingungen wie bei der ersten 22000 g Zentrifugation.) Das resultierende Pellet wurde verworfen, der Überstand in ein neues Polycarbonatröhrchen überführt, austariert, mit Aluminiumkappen (Beckman Nr. 338824) verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Am nächsten Tag wurde der Überstand 2 Stunden bei 215000 g (55000 rpm), 20°C, in einem Beckman R 60 Ti Rotor zentrifu-

giert. Das abzentrifugierte Sediment (P_{215}) wurde mit Hilfe von Ultraschall in 25 ml TBS bzw. PBS^- mit 0,1% Sarkosyl und 10% NaCl aufgenommen, der Überstand verworfen. Die Lösung erschien jetzt klar oder nur leicht trübe.

Eine letzte, hochtourige Zentrifugation für 150 Minuten bei 215000 g (Bedingungen wie bei der vorhergehenden Zentrifugation) führte zu einem kleinen, bernsteinfarbenen oder bräunlichen Pellet (P_{215S}). Dieses Sediment wurde mit Ultraschall in 1 ml (oder weniger) TBS oder PBS^- mit 10% NaCl und 1% Zwittergent 3-14 (oder 1% Sarkosyl) aufgenommen und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Rotorkapazität (Zahl der Zentrifugenröhrchen) erlaubte es, bis zu 20 Hirne in einem Arbeitsgang aufzuarbeiten.

Die Überprüfung des Infektiositätsgehaltes jeder Fraktion des Aufarbeitungsganges erfolgte durch Inkubationszeitvergleiche (siehe 4.1.10). Die Reinigung und Anreicherung des Scrapie-Agens wurden durch Gelelektrophoresen und chemische Analysen nachgewiesen.

4.3.4 Schnelle Isolation der Scrapie-Infektiosität aus detergenzgelöstem Hirnhomogenat

Eine schematische Darstellung des Reinigungsprozesses erfolgt im Ergebnisteil unter Punkt 5.3 (siehe Abb. 15). Diese Methode ist eine vereinfachte Version des unter 4.3.1 - 4.3.3 beschriebenen Trennungsganges und verzichtet auf die Enzymbehandlung. Fünf Hirne von klinisch erkrankten Hamstern wurden in einer Glasflasche mit 45 ml einer 10%-igen Sarkosyllösung in bidest. Wasser versetzt und 30 Sekunden mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Der pH-Wert der Sarkosyllösung wurde zuvor mit 1 M NaH_2PO_4 (Merck Nr. 6346) auf 7,4 eingestellt (etwa 1 ml auf 100 ml).

Das Homogenat wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und der noch verbliebene Schaum durch Zugabe von 3 Tropfen Oktanol entfernt. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 22000 g, 20°C, wurde das Sediment verworfen und der Überstand, wie unter 4.3.3 beschrieben, zweimal hochtourig zentrifugiert. Lösungsmedium war jedoch bidest. Wasser anstelle von Puffer und die zweite Zentrifugation wurde in Gegenwart von 1% Sarkosyl und 10% NaCl durchgeführt.

Die Aufbewahrung aller Sarkosyl enthaltenden Lösungen erfolgte in Plastikflaschen, um Reaktionen mit der Gefäßwand zu vermeiden. (Bei Aufbewahrung in Glasflaschen wurde nach einigen Wochen ein unlöslicher Niederschlag, vermutlich von Sarkosylsalzen, beobachtet.)

4.3.5 Röhrextraktion von Scrapie-Infektiosität nach Reinigung durch differentielle Zentrifugation

Eine schematische Darstellung der Extraktion ist unter Punkt 5.3 im Ergebnisteil (siehe Abb. 17) zu finden.

Das Sediment P_{215S} aus 5 Hamsterhirnen wurde in 1 ml TBS mit 1% Sarkosyl und 10% NaCl aufgewirbelt und mit einem teflonbeschichteten Magnet (5 x 2 mm) mindestens 1 Stunde bei 37°C gerührt. Das gelöste Sediment wurde in konische Eppendorfgefäße überführt und 15 Minuten in der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert. Denach wurde der Überstand mit einer Eppendorf-Pipette abgehoben, verworfen und das Sediment P(E)I in 1 ml TBS mit 1% Sarkosyl und 10% NaCl aufgewirbelt.

Nach Zugabe von 5 µg Proteinase K wurde das Sediment für 2 Stunden bei 37°C gerührt. Anschließend folgte eine erneute 15-minütige Eppendorf-Zentrifugation, nach der der Überstand verworfen wurde. Das Sediment P(E)II wurde in 1 ml 0,1%

Sarkosyl aufgewirbelt, 1 Stunde bei 37°C gerührt und wieder in einer 15-minütigen Eppendorf-Zentrifugation sedimentiert (P(E)III). Diese Extraktion wurde einmal wiederholt und führte zum Sediment P(E)IV.

4.3.6 Sucrose Gradienten-Zentrifugation

4.3.6.1 Kombinierte Sedimentations- und Dichte-Zentrifugation

Eine weitere Reinigung des mit Ultraschall in 0,5 ml TBS mit 1% Zwittergent 3-14 und 5% NaCl aufgenommenen Sediments P_{215S} konnte auch in einer kombinierten Sedimentations- und Dichte-Zentrifugation durch einen Sucrosegredienten erreicht werden. Der Gradient wurde in einem Gradientenmischer (Hölzel, Dorfen/Obb., Mischer Nr. 42100, Rührmotor mit Stativstange Nr. 35100) und mit einer Schlauchpumpe (Desaga, Heidelberg, STA-Vielfach-Schlauchpumpe Nr. 131900) in Polyallomerröhrchen (Kontron Nr. 91-90221) gegossen. Er bestand aus 5-20% Sucrose (Merck Nr. 7653), 10% NaCl und 0,1% Zwittergent 3-14 in TBS. Vor dem Auftragen wurden die Proben kurz mit Ultraschall behandelt. Die Zentrifugation erfolgte für 6 Stunden in einem SW 41 Rotor (Beckman) bei 200000 g (40000 rpm) und 4°C.

Anschließend wurde der Überstand mit einer Pipette bis auf ca. 0,3 ml abgezogen und verworfen. Das kleine, braun-gelbe, ringförmige Sediment wurde mit wenig Ultraschall gelöst, mit TBS, 10% NaCl, 0,1% Zwittergent 3-14 aufgefüllt und 3 Stunden bei 200000 g zentrifugiert, um die Sucrose zu entfernen. Danach wurde der Überstand verworfen und das Sediment (P_{Sucr.I}) in 0,2 ml TBS, 10% NaCl, 1% Zwittergent 3-14 aufgenommen.

4.3.6.2 Sedimentations-Zentrifugation

Um den Sedimentationskoeffizienten (s-Wert in Svedberg-Einheiten) des Scrapie-Agens zu bestimmen, wurde das Sediment aus der kombinierten Sedimentations- und Dichte-Zentrifugation mit Hilfe von Ultraschall in 200 µl TBS mit 10% NaCl und 1% Zwittergent 3-14 aufgenommen und auf einen Sucrosegradienten (wie in 4.3.6.1) aufgetragen. Die Zentrifugenröhrchen wurden zuvor mit einer Schablone in 0,7 cm Abstand (= 1 ml Volumen) markiert. Die Zentrifugation erfolgte für 90 Minuten im SW 41 Rotor bei 150000 g (35000 rpm), 4°C. Am Ende des Laufs wurde bei 3000 rpm die Bremse ausgeschaltet, um Verwirbelungen zu vermeiden.

Nach Einspannen des Zentrifugenröhrchens in ein Laborstativ wurden durch Anstechen von der Seite zehn 1 ml-Fractionen entnommen (2 ml Spritzen, Kanülen Nr. 2) und in Polyallomerröhrchen überführt. Das Sediment mit ca. 0,2 ml Restvolumen wurde nach Abdichten des Röhrchens (Parafilm) mit TBS, 10% NaCl, 0,1% Zwittergent 3-14 auf 1 ml aufgefüllt, mit Ultraschall gelöst und in ein neues Röhrchen überführt.

Alle Proben wurden mit TBS, 10% NaCl und 0,1% Zwittergent 3-14 aufgefüllt, austariert und 3 Stunden bei 200000 g (40000 rpm), 4°C, im SW 41 Rotor zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände verworfen und die Sedimente in 0,3 ml TBS (oder weniger) bei -20°C eingefroren.

Alle Gradientenlösungen wurden unter sterilen Bedingungen angesetzt und 2 Stunden bei 80°C im Wärmeschrank erhitzt. Die Einwaagen der Substanzen erfolgten als Gewichtsprozente (w/w).

Um die Absorption des gereinigten Materials an die Gefäßwände zu vermeiden, wurden die Polyallomerröhrchen 10 Minuten

in 0,1 M EDTA (Merck Nr. 8417) gekocht und mit dest. Wasser gespült (111).

Referenzgradienten, die simultan unter gleichen Bedingungen zentrifugiert wurden, enthielten: 30 s und 50 s Ribosomenuntereinheiten aus *E. coli* (erhalten von Prof. H. Wittmann, Max Planck-Institut für Genetik) bzw. ϕ x 174 Virus (Miles Laboratories, Nr. 21-793). Diese Gradienten wurden nach der Zentrifugation mit einer Glaskapillare vom Boden her abgesaugt, über eine Durchflußphotozelle mit angeschlossenem Schreiber bei 260 nm analysiert und in 1 ml Fraktionen über einen Fraktionssammler gesammelt. (Schlauchpumpe: Gilson Minipuls 2, Durchflußphotometer: Gilson Spektrochrom M, Fraktionssammler: Gilson Microcol TDC 80, Schreiber: Linear 200, Abimed).

Die Dichte der Fraktionen wurde zur Überprüfung des Gradienten im Refraktometer (Carl Zeiss Nr. 16033) gemessen.

4.3.7 CsCl Dichtegradienten-Zentrifugation

Um die Dichte der infektiösen Partikel zu bestimmen, wurde unter sterilen Bedingungen hochgereinigtes Material aus der Sucrose-Sedimentations-Zentrifugation (siehe 4.3.6.2) bzw. extrahiertes Sediment (siehe 4.3.5) auf einen CsCl Gradienten aufgetragen.

Der Gradient wurde geformt, indem eine 35%-ige (w/w) CsCl Lösung in Polyallomerröhrchen (Kontron Nr. 91-90219) 40 Stunden bei 179000 g (50000 rpm), 4°C, in einem SW 65 K Rotor (Beckman) zentrifugiert wurde. Am Ende des Laufs wurde bei 3000 rpm die Bremse abgestellt, um Verwirbelungen zu vermeiden.

Auf diesen Gradienten wurden die gepoolten Fraktionen 4-9 der Sedimentations-Zentrifugation bzw. extrahiertes Sediment P(E) aufgetragen und 6 Stunden unter den obigen Bedingungen zentrifugiert. Die aufgetragene Probe war in 0,2 ml 5% NaCl gelöst und mit Ultraschall behandelt.

CsCl-Gradientenentnahme per Hand durch Anstechen des Zentrifugenröhrchens von unten:

Zunächst mußte das Gradientenröhrchen in einer Stativmuffe festgeklemt werden. Dann wurde das Röhrchen mit einem Silikonstopfen verschlossen, der mit einer 0,6 mm Kanüle durchbohrt war, um den Oberflächendruck mit einer aufgesetzten Spritze oder durch Verschließen mit dem Finger regulieren zu können. Anschließend wurde das Röhrchen von unten mit einer Nadel angestochen, über das erste Auffangglas geführt, die Nadel zurückgezogen und die Tropfen aufgefangen. Es wurden 11 Fraktionen à 8 Tropfen (= 430 µl) gesammelt.

Die Dichte der Fraktionen wurde zur Überprüfung des Gradienten im Zeiss Refraktometer gemessen.

4.3.8 Chemikalien und Lösungen für die Isolierung von Scrapie-Agens aus Hamsterhirnen

1. PBS⁻, pH 7,4 (26)

Dulbeccos phosphate buffered saline, ohne Calcium und Magnesium. In bidest. Wasser waren gelöst (g/l):

NaCl	8	(Merck Nr. 6406)
KCl	0,2	(Merck Nr. 4936)
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	1,44	(Merck Nr. 6580)
KH ₂ PO ₄	0,2	(Merck Nr. 4873)

Die Lösung wurde steril filtriert und autoklaviert.

2. TBS, pH 7,4

Tris buffered saline.

In bidest. Wasser waren gelöst (g/l):

Tris (hydroxymethyl) aminomethan

1,2 (Merck Nr. 8382)

NaCl 8,0 (Merck Nr. 6406)

Der pH-Wert wurde mit HCl (Merck Nr. 317) eingestellt.

3. Sarkosyl (Serva Nr. 27570) ist N-Lauroylsarkosin, Na-Salz eines anionischen Detergenz (57).

4. Zwittergent 3-14 N(-tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propansulfonat) ist ein zwitterionisches Detergenz (M.W. 363,6) mit einem Alkylrest von 14 C-Atomen (Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, Nr. 693017) (52).

5. 0,5 M CaCl_2 -Lösung

7,4 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck Nr. 2382) wurden in 100 ml bidest. Wasser gelöst und autoklaviert.

6. 0,05 M Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

8,71 mg PMSF (Boehringer Nr. 236608) wurden in 1 ml Isopropanol gelöst, im Kühlschrank aufbewahrt und bis zu einem Monat verwendet. PMSF bindet kovalent an Proteine und kann so Enzyme inaktivieren (32, 59).

7. Enzyme

a) Proteinase K (27, 88)

Proteinase K aus *Tritirachium album* (Serva Nr. 33752) wurde als Stammlösung von 1 mg/ml in bidest. Wasser portioniert und bei -20°C eingefroren.

Proteinase K ist eine Endoprotease ohne Spaltungsspezifität und besitzt keratinolytische Aktivität. Sie wird zur Isolierung von nativer mRNA und hochmolekularer DNA ver-

wendet.

b) Micrococcus-Nuclease (56, 113)

Nuclease aus Staphylococcus aureus (Boehringer, Mannheim Nr. 107921) wurde in bidest. Wasser gelöst (1 mg/ml) und bis zur Verwendung eingefroren.

Das Enzym hat sowohl exo- als auch endo-5'-Phosphodiesterase-Aktivität und zerlegt DNA und RNA zu 3'Nukleotiden. Zur Aktivierung benötigt die Nuclease Calcium-Ionen.

8. Antibiotika Stammlösung

Die Stammlösung enthielt je 100000 E Penicillin G, Kaliumsalz (Serva Nr. 31749) und Streptomycinsulfat (Serva Nr. 35500) pro ml. Die Lösung wurde steril filtriert, portioniert und bei -20°C aufbewahrt.

Antibiotika Gebrauchslösung

Zu 100 ml PBS⁻ wurden 0,1 ml Antibiotika Stammlösung gegeben und damit eine Endkonzentration von 100 E/ml Medium eingestellt.

4.4 Gelelektrophorese

4.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach U.K. Laemmli (71)

Verwendet wurde ein vertikales Gelelektrophorese-System von BRL (Nr. 1071, Model V 16-2) mit 0,8 mm dicken Spacern.

Arbeitsanleitung:

1. Reinigen und Zusammensetzen der Glasplatten

a) Säubern der Platten mit Leitungswasser und Spülmittel.
(Die Platten dürfen nur mit Handschuhen angefasst werden.)

b) Anschließend die Glasplatte mit entionisiertem Wasser

abspülen und an der Luft trocknen lassen.

- c) Nicht benutzte Platten in einem geschlossenen Eimer mit Wasser und etwas HCl aufbewahren.
- d) Zwischen eine kleine und eine große Glasplatte werden Teflon-Spacer zum Abdichten gelegt und die Platten mit Metallklammern zusammengehalten.
- e) Markieren der Grenze Trenngel/Sammelgel (3,5 cm vom oberen Rand).

2. Gießen des Trenngels

- a) Schlauchpumpe sowie Gelmischer mit entionisiertem Wasser durchspülen.
- b) Lösungen für das Trenngel nach Tabelle herstellen (1 Gel = 20 ml), zunächst ohne Ammoniumperoxodisulfat.
- c) Entgasen der Lösungen an der Wasserstrahlpumpe, danach Zugabe von Persulfat.
- d) Einfüllen der Lösungen in den Gradientenmischer und Einklemmen der Auslaufschläuche zwischen den Glasplatten.
- e) Rührmotor und anschließend Schlauchpumpe anschalten, Gradientenmischer öffnen. Dauer des Gießens ca. 10 Min.

3. Polymerisieren

- a) Auf das fertige Trenngel wird mit einer Pasteurpipette etwas wassergesättigtes Butanol gegeben.
- b) Anschließend wird das Gel zum Polymerisieren für 1 Stunde bei 60°C in den Wärmeschrank gestellt.
- c) Nach Abkühlen des Gels wird das Butanol mit 1:4 verdünntem 1,5 M Tris-Cl Puffer abgespült.
- d) Mit hartem Filterpapier den Rest des Puffers absaugen.

4. Gießen des Sammelgels

- a) Lösung für das Kammgel nach Tabelle herstellen. (Persulfat zuletzt dazu.)
- b) Kamm zwischen die Glasplatten schieben und mit einer Pasteurpipette die Sammelgellösung einfüllen. Luftblasen

unter dem Kamm entfernen.

- c) Bei Raumtemperatur polymerisieren lassen.
- d) Spritze mit Elektrophoresepuffer füllen und Kamm unter Pufferzugabe langsam entfernen.
- e) Gelreste an der Glasplatte abwischen und die Kammtaschen mit Puffer durchspülen.
- f) Richten der Kammtaschen mit einer 25 µl Hamiltonspritze (Nr. 702 N).

5. Probenvorbereitung

I) Sedimentiertes Untersuchungsmaterial:

Mit 20 µl Laemmli Probenpuffer in Eppendorf-Gefäßen 10 Minuten gekocht, danach unlösliches Material in der Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert.

II) Gelöstes Untersuchungsmaterial:

Entweder 10 µl Material mit 10 µl doppelt konzentriertem Laemmli Probenpuffer versetzt, oder 20 µl Material mit 5 µl fünfmal konzentriertem Laemmli Probenpuffer versetzt und 10 Minuten gekocht.

III) Acetonfällung detergenzbehandelter Proben

- a) Untersuchungsmaterial in 1% SDS mit Ultraschall behandeln, in Eppendorf-Gefäßen mit 9 Teilen Aceton, -20°C , (Merck Nr. 13) versetzen, mischen und länger als 1 Stunde bei -20°C stehen lassen.
- b) 30 Minuten Eppendorf-Zentrifugation im Kühlraum (4°C), Überstand bis auf ca. 20 µl absaugen und werfen.
- c) Trocknen im Exsikkator über P_{2}O_{5} (Granusic A, J.T. Baker, Deventer, Holland)
- d) In Laemmli-Puffer wie bei I. aufnehmen.

6. Einspannen der Platten in die Elektrophorese-Apparatur

- a) In die untere Elektrophoresekammer Elektrophoresepuffer füllen und den unteren Teflon-Spacer zwischen den beiden Glasplatten entfernen.
- b) Platten mit dem Gel in der Elektrophoresekammer einspan-

nen. Luftblasen mit Spritze und Kanüle entfernen, die obere Elektrophoresekammer mit Agarose gegen die Glasplatte abdichten.

- c) Obere Elektrophoresekammer mit Puffer füllen, bis die unteren Glasplatten gut bedeckt sind.
- d) Proben mit einer 25 µl Hamiltonspritze auftragen.
- e) Elektrophoresegerät an das Spannungsgerät anschließen und pro Gel eine konstante Stromstärke von 20 mA anlegen, bis die Proben ins Sammelgel eingewandert sind (etwa 30 Minuten).
- f) Anschließend im Kühlraum bei 20 mA/Gel weiter laufen lassen, bis die Farbbande aus dem Gel ausgewandert ist.

7. Gel von den Glasplatten trennen.

- a) Mit einem feinen Spatel zwischen die Glasplatten gehen und eine Glasplatte langsam ablösen.
- b) Eine Schale mit Fixierlösung bereitstellen und die Glasplatte mit dem Gel nach unten darüber führen.
- c) Mit dem Spatel das Gel an einer Ecke ablösen, in die Fixierlösung fallen lassen und auf einem Schüttelapparat (Guwina-Hofmann GmbH) schütteln.

Trenngel	12%	17%	Sammelgel 5%
30% Acrylam., 0,8% Eis.	7,90 ml	11,22 ml	1,70 ml
1,5 M Tris-Cl, pH 8,8	5,00 ml	5,00 ml	2,50 ml*
10% SDS	0,20 ml	0,20 ml	0,10 ml
H ₂ O	6,90 ml	3,60 ml	5,66 ml
TEMED	5 µl	5 µl	10 µl
10% Persulfat	40 µl	40 µl	50 µl
total	20 ml	20 ml	10 ml

Tabelle zum Herstellen von 12-17% SDS-Polyacrylamidgelen.

* 0,5 M Tris-Cl, pH 6,8

Lösungen für die Gelelektrophorese:

Alle Lösungen wurden mit bidest. Wasser angesetzt.

- a) 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid (1:37,5)
30 g Acrylamid (Roth Nr. 7871)
+ 0,8 g N,N'-Methylen-bis-acrylamid (Roth Nr. 7867)
mit H₂O auf 100 ml auffüllen
+ 25 g Amberlite MB-2 Ionenaustausch-Harz (Serva Nr. 40711),
über Nacht im Kühlraum rühren, dann durch Millipore-
filter filtrieren, bei 4°C lagern.
- b) 1,5 M Tris-Cl, pH 8,8
90,86 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck Nr. 8382)
in 400 ml H₂O lösen, mit HCl conc. auf pH 8,8 einstellen,
mit H₂O auf 500 ml auffüllen. Bei 4°C lagern.
- c) 0,5 M Tris-Cl, pH 6,8
30,29 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck Nr. 8382)
in 400 ml H₂O lösen, mit HCl conc. auf pH 6,8 einstellen,
mit H₂O auf 500 ml auffüllen. Bei 4°C lagern.
- d) 10% SDS
10 g Dodecylsulfat-Na-Salz (Serva Nr. 20760) mit H₂O auf
100 ml auffüllen.
- e) TEMED
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (Merck Nr. 10732). Bei 4°C
lagern.
- f) 10% Persulfat
0,1 g Ammoniumperoxodisulfat (Merck Nr. 1201) mit H₂O auf
1 ml auffüllen. Bei 4°C lagern, ist dann mindestens 2
Wochen stabil.
- g) Elektrophoresepuffer
30,29 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck Nr. 8382)
144,13 g Glycin (Merck Nr. 4201)
10,00 g SDS (Serva Nr. 20760)
mit H₂O auf 10 l auffüllen.

h) Laemmli Probenpuffer

10,00 ml Glycerin (Fluka Nr. 49770)

+ 0,154 g 10 mM Dithioerythrit (DTE) (Merck Nr. 2451)

+ 23,00 ml 10% SDS

+ 12,50 ml 0,5 M Tris-Cl, pH 6,8 (Lösung c)

mit H₂O auf 100 ml auffüllen und mit einigen
Tropfen Bromphenolblau versetzen.

Eichproteine:

Es wurden Lösungen von 10 und 100 ng Protein/ml in Laemmli Probenpuffer hergestellt, 10 Minuten gekocht und bei 4°C aufbewahrt.

a) Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumin), M_r 68000
(Serva Nr. 11920)

b) Chymotrypsinogen A, M_r 26000 (Serva Nr. 17200).

c) Cytochrom C, M_r 12300 (Serva Nr. 18020).

d) Rinderserumalbumin, M_r 68000; Ovalbumin M_r 43000; α-Chymotrypsinogen, M_r 25700; β-Lactoglobulin M_r 18400 und Cytochrom C, M_r 12300 als Mischung. (Bethesda Research Laboratories, Nr. 6001SA)

4.4.2 Silberfärbung der Gele (87)

Alle Arbeitsvorgänge sind unter Schütteln durchzuführen (Schüttelapparat), alle Lösungen sind mit bidest. Wasser anzusetzen.

1. Gel 30 Minuten in 50% Methanol und 7,5% Essigsäure.
2. Gel 30 Minuten in 5% Methanol und 7,5% Essigsäure.
3. Gel 30 Minuten in 5% Glutaraldehyd (Merck Nr. 820603).
4. 2 Stunden oder länger in Wasser schütteln lassen, dabei das Wasser mindestens dreimal erneuern.

5. Gel in 100 ml frisch angesetzte ammoniakalische Silberlösung und nicht länger als 15 Minuten färben.
6. Zweimal 2 Minuten in bidest. Wasser spülen.
7. Zugabe von 200 ml frisch bereitetem Entwickler.
8. Wenn der Gelhintergrund braun wird (ca. 10 Minuten), Entwickler absaugen und bidest. Wasser dazu geben.
9. Nach 15 Minuten das Gel in einem neuen Behälter mit Wasser lagern.

Entfärben der Gele:

Gleiche Teile von Lösung c und d mischen. Um die Entfärbung zu verlangsamen, wird die Mischung 1:10 verdünnt.

Lösungen für die Silberfärbung:

a) Ammoniakalische Silberlösung (100 ml)

für 1 Gel: 21,0 ml 0,36% NaOH

1,4 ml 25% NH_3 (Merck Nr. 5432)

73,5 ml H_2O

0,8 g AgNO_3 (Merck Nr. 1512) in 4 ml H_2O

AgNO_3 in H_2O lösen; zur NaOH- NH_3 -Lösung unter Rühren (Magnetrührer) zugeben.

b) Entwickler für 1 Gel

200 μl Zitronensäure 5% (Merck Nr. 244)

100 μl Formaldehyd 37% (Merck Nr. 3999)

mit H_2O auf 200 ml auffüllen.

c) 37 g NaCl + 37 g CuSO_4 (Merck Nr. 2790) mit 850 ml H_2O versetzen. Dann NH_3 25% zugeben, bis der Niederschlag vollkommen gelöst ist und mit H_2O auf 1 l auffüllen.

d) 436 g Na-Thiosulfat (Merck Nr. 6518) mit H_2O auf 1 l auffüllen.

4.4.3 Coomassie Brilliant Blue-Färbung der Gele

Alle Arbeitsvorgänge sind unter Schütteln durchzuführen (Schüttelapparat).

1. Gel 30 Minuten in 50% Methanol und 7,5% Essigsäure.
2. Gel 30 Minuten in 5% Methanol und 7,5% Essigsäure.
3. Gel 40 Minuten in 100 ml Coomassie-Färbelösung.
4. Mehrmals 30-60 Minuten in 5% Methanol und 7,5% Essigsäure.

Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung:

1,25 g Coomassie Brilliant Blue (R250) (Serva Nr. 17525)

454 ml Methanol 50% (Merck Nr. 6009)

46 ml Eisessig (Merck Nr. 56)

Der Farbstoff wird in Methanol gelöst, dann Eisessig hinzugegeben, gut gemischt und filtriert (Whatman Nr. 1 Filterpapier).

5. ERGEBNISSE

5.1 Reinigung von Scrapie-Infektiosität durch differentielle Zentrifugation

Zunächst soll das entwickelte Schema der Reinigung durch differentielle Zentrifugation dargestellt und anschließend erläutert werden, wie diese Aufarbeitung durch kontrollierte Experimente entwickelt wurde. Dieses Schema basiert auf folgenden grundlegenden Beobachtungen:

- a) die Scrapie-Infektiosität ist an Membranfraktionen gebunden (82, 83, 107),
- b) die Scrapie-Infektiosität wird durch das Detergenz Sarkosyl nicht abgebaut (98).

Zusätzlich wird angenommen, daß Scrapie durch einen viralen Erreger hervorgerufen wird. Deshalb lag es auf der Hand, nach der Isolierung einer Membranfraktion aus Gehirnen ein konventionelles Reinigungsschema zur Isolierung eines nicht lipidhaltigen Virus anzuwenden, um die Infektiosität anzureichern. Viren können im allgemeinen durch Ultrazentrifugation in reiner Form isoliert werden. Man beginnt daher mit einer Anreicherung des Scrapie-Erregers durch differentielle Zentrifugation (siehe Abb. 8).

Zu Beginn der Aufarbeitung wurden Hamsterhirne in Gegenwart von Proteinase K homogenisiert, um die Infektiosität aus dem Hirnmaterial freizusetzen und anschließend Zelltrümmer sowie Zellkerne niedertourig abzentrifugiert. Nach Inaktivierung der Proteinase K mit PMSF wurde der Überstand (S_3) mit Micrococcus-Nuclease versetzt, um nicht geschützte, wirtseigene DNA und RNA zu hydrolysieren und in Lösung zu bringen. Dann wurde die membrangebundene Infektiosität abzentrifugiert (P_{22}) und die Abbauprodukte der Enzymbehandlung mit dem Überstand verworfen. Das infektiöse Sediment wurde mit Ultraschall in Gegenwart von Detergenz gelöst und die Infek-

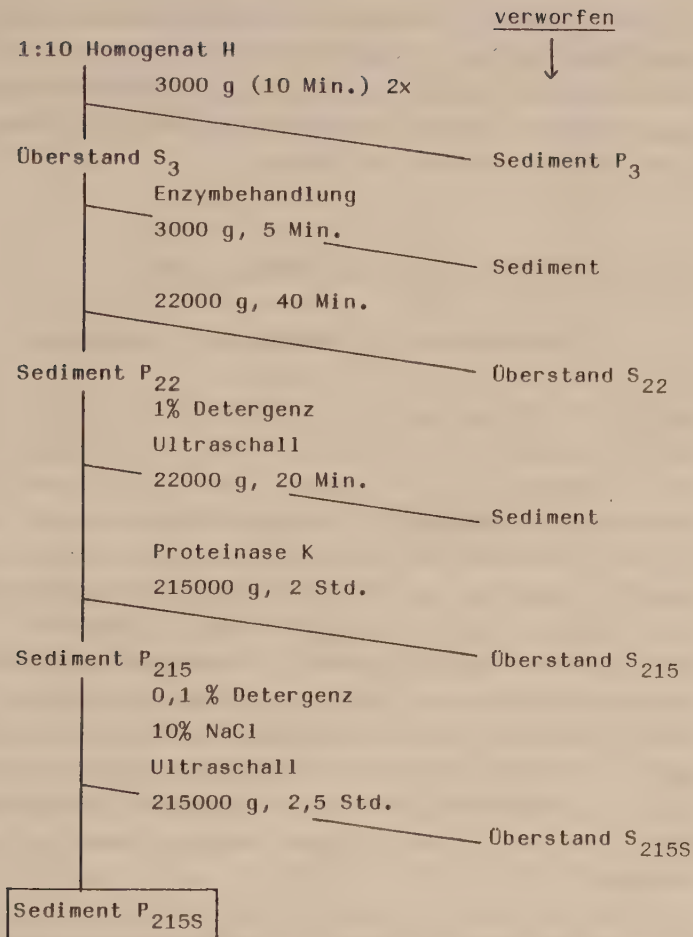


Abbildung 8

Schema zur partiellen Reinigung von Scrapie-Infektiosität durch differentielle Zentrifugation aus Gehirnen erkrankter Hamster. Die Fraktionen sind mit P für Sediment (pellet) und S für Überstand (supernatant) bezeichnet und mit Indizes versehen, die ein Tausendstel der Erdbeschleunigung (g) darstellen, bei der zentrifugiert wurde. (Details siehe Material und Methoden.)

tiosität hochtourig sedimentiert. Eine letzte, hochtourige Zentrifugation durch salzhaltigen Puffer führte zu einem kleinen, bräunlichen Sediment (P_{215S}). Dieses Sediment mit angereicherter Scrapie-Infektiosität diente als Ausgangsmaterial für die weitere Reinigung.

5.1.1 Optimierung des Reinigungsschemas

5.1.1.1 Inaktivierung von Proteinase K durch PMSF

Hamstergehirne wurden in Gegenwart von Proteinase K homogenisiert, um eine erhöhte Freisetzung von Infektiosität aus dem Hirnmaterial zu erreichen. In ungereinigtem Material inaktiviert Proteinase K die Infektiosität nicht (23, 74, 77, 96). Da aber Proteinase K die Micrococcus-Nuclease angreift, mußte sie vor der nachfolgenden Nuclease-Behandlung mit Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) inaktiviert werden. Andererseits inaktiviert PMSF in hohen Konzentrationen die Scrapie-Infektiosität (100). Die Inaktivierung der Proteinase K sollte deshalb mit möglichst wenig PMSF durchgeführt werden. Es wurde darum eine niedrige Proteinase K-Konzentration, die mit wenig Inhibitor inaktiviert werden kann, eingesetzt und die niedrigste noch wirksame PMSF-Konzentration bestimmt.

Fünf Gramm Schafhirn wurden bis zum Überstand 3000 g aufgearbeitet (siehe 4.3.1). In dieser Fraktion wurde der Proteinabbau durch Proteinase K in Gegenwart verschiedener PMSF-Konzentrationen bestimmt (siehe Tabelle 2).

Probe	Konzentration von PMSF (mM)	Freigesetztes ^3H -Leucin (cpm)	Inaktivierung der Proteinase in %
1	2	2529	100
2	1	2904	99
3	0,2	2930	99
4	0,1	3713	97
5	0,05	4527	95
6	0,02	9632	85
7	0,01	25334	50
8	0	43994	0
9	0	3075	ohne Proteinase K

Tabelle 2

Inaktivierung von Proteinase K im Überstand 3000 g durch PMSF, gemessen durch den Abbau von radioaktiv markiertem Protein. (Erklärung siehe Text.)

Zum Nachweis von endogenen, im Überstand vorhandenen Proteasen diente ohne Proteinase K aufgearbeitetes Hirnmateriale (Probe 9). Zu jeder Probe (1 ml) wurden nach 30 Minuten PMSF-Einwirkung bei Raumtemperatur 10 μl ^3H -Leucin markiertes Protein pipettiert. Nach weiteren 30 Minuten bei 37°C wurden die Proben mit 5 ml Äthanol versetzt und das präzipitierte Protein in der Minifuge bei 3000 g abzentrifugiert. Zwei ml des Überstandes wurden mit 10 ml Unisolve 100 (Zinsser Nr. 16973) versetzt und im Szintillationszähler gezählt.

Aus Tabelle 2 geht hervor, daß mit steigenden PMSF-Konzentrationen weniger Radioaktivität in den Überständen gefunden und somit weniger Protein durch Proteinase K abgebaut wird. Bei einer PMSF-Konzentration von 2 mM, die Proteasen vollständig inaktiviert, wurden 2500 cpm im Überstand gefunden (Probe 1). Dieser Meßwert setzt sich zusammen aus freiem, radioaktivem Leucin als Verunreinigung des markierten Pro-

teins und Restmengen des radioaktiv markierten Proteins nach unvollständiger Alkoholpräzipitation. Auch in den Zählraten der anderen Proben ist eine Leerwertradioaktivität von 2500 cpm enthalten, die für die Berechnung der prozentualen Inaktivierung der Proteinase K von der gemessenen Zählrate abgezogen wurde.

Für die Reinigung des Scrapie-Agens wurde eine Konzentration von 0,05 mM PMSF gewählt. Bei dieser Konzentration wird die Proteinase K zu mehr als 95% inaktiviert und eine Einfluß auf die Scrapie-Infektiosität war nicht zu erwarten. Verglichen mit dem Proteinabbau durch Proteinase K ist die Aktivität endogener Proteasen gering (Probe 9).

5.1.1.2 Einfluß von PMSF auf die Micrococcus-Nuclease

Um festzustellen, ob PMSF das aktive Zentrum der Nuclease sulfonyliert und damit das Enzym inaktiviert, wurde der Nukleinsäureabbau durch die Nuclease in Gegenwart von PMSF gemessen.

Fünf Gramm Schafhirn wurden in PBS⁻ bis zum Zentrifugationsüberstand 3000 g aufgearbeitet. Nach der Proteinhydrolyse mit Proteinase K wurden PMSF, Tris, CaCl₂ und Micrococcus-Nuclease dazupipettiert (siehe 4.3.1). Von dieser Lösung wurden 1 ml Proben entnommen, mit 10 µl ³H-Uracil markierter RNA versetzt und bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 2,5 ml Äthanol gefällt, 10 Min. bei 3000 g in der Minifuge zentrifugiert und 2 ml Überstand in 10 ml Unisolve 100 im Szintillationszähler gezählt (siehe Tabelle 3).

Um die eingesetzte Radioaktivität zu messen, wurden 10 µl ³H-Uracil markierter RNA zu 3,5 ml PBS⁻ pipettiert und 2 ml

dieser Lösung gezählt (Probe 7).

Probe	Inkubations- zeit (Std.)	PMSF (mM)	abgebaute ³ H-RNA (cpm)	% Nuclease- aktivität
1	2	0	3836	≅ 100
2*	2	0,05	475	-
3	1	0,05	2722	70
4	1,5	0,05	3035	75
5	2	0,05	3850	100
6	2	0,5	2127	50
7	eingesetzte Radioaktivität		5909	-

Tabelle 3

Einfluß von PMSF auf die Micrococcus-Nuclease Aktivität im Überstand 3000 g, gemessen durch den Abbau von radioaktiv markierter RNA. *Probe 2 wurde ohne Nuclease inkubiert. Die Zählraten sind Mittelwerte aus 2 Messungen. (Erklärung siehe Text.)

Ohne Nuclease-Zugabe waren nach Alkoholpräzipitation 8% der eingesetzten Radioaktivität im Überstand (Probe 2). Vermutlich ist die RNA durch den Alkohol nicht vollständig präzipitiert worden. Denkbar ist auch der Abbau durch endogene Nucleasen sowie das Vorhandensein von freiem, radioaktiven Uracil als Verunreinigung der markierten RNA. Diese Leerwertradioaktivität wurde für die Berechnung der prozentualen Nucleaseaktivität von den gemessenen Zählraten abgezogen.

Nach 2 Stunden Enzymtätigkeit wurden sowohl mit als auch ohne PMSF gleiche Anteile der eingesetzten Radioaktivität nicht präzipitierbar im Überstand gefunden (Proben 1 und 5). Die im Trennungsgang verwendete Konzentration von 0,05 mM PMSF hat demnach keinen Einfluß auf die Aktivität der Micrococcus-Nuclease. Erst bei zehnfach höherer PMSF-Konzentra-

tion (Probe 6) ist eine 50%-ige Reduktion der Enzymaktivität gegenüber der Kontrolle ohne PMSF (Probe 1) zu beobachten.

5.1.1.3 Sedimentation von Infektiosität mit einer Membranfraktion in Gegenwart und Abwesenheit von Detergenz

Es ist bekannt, daß die Scrapie-Infektiosität sehr hydrophob und eng membranassoziiert ist (82, 83, 107). Die Mehrzahl integraler Membranbestandteile kann mit dem anionischen Detergenz SDS extrahiert werden. Da SDS die Scrapie-Infektiosität inaktiviert (100), sollte versucht werden, den Erreger mit dem anionischen Detergenz Sarkosyl von Membranbestandteilen zu isolieren. Daher haben wir das Sedimentationsverhalten der membrangebundenen Scrapie-Infektiosität im enzymbehandelten Überstand S_{3enz} in Gegenwart und Abwesenheit von 1% Sarkosyl untersucht.

Die Überstände (S_{3enz}) wurden 40 Minuten bei 22000 g, 20°C, zentrifugiert und die Infektiosität der resultierenden Sedimente bestimmt. Die entsprechenden Überstände (S_{22}) wurden 2 Stunden bei 215000 g, 20°C, zentrifugiert und der Titer in den danach erhaltenen Sedimenten (P_{215}) und Überständen (S_{215}) bestimmt.

Der Titer der untersuchten Fraktionen wurde durch Inkubationszeitvergleiche anhand der Dosis-Wirkungskurve bestimmt (siehe 4.1.10). Bei dieser Methode führt die Titerreduktion um eine Zehnerstufe zu einer Inkubationszeitverlängerung von ca. 12 Tagen. Die Ergebnisse der Titration einer 10^{-5} -Verdünnung zeigt Tabelle 4.

Inkubationszeit in Tagen ($\pm$ Standardabweichung) und relativer Gehalt an Infektiosität (in Klammern)		
Fraktion	- Detergenz	+ Detergenz
S _{3enz}	103 $\pm$ 5 ($\approx$ 100%)	-
P ₂₂	98 $\pm$ 0 (125%)	112 $\pm$ 5 (15%)
P ₂₁₅	>150 (<1%)	110 $\pm$ 3 (120%)
S ₂₁₅	>150 (<1%)	153 $\pm$ 0 (<1%)

Tabelle 4

Inkubationszeit und relativer Gehalt an Scrapie-Infektiosität in Fraktionen nach Differentialzentrifugation in Abwesenheit und mit Detergenz. (Details siehe Text.)

Die Titration des Ausgangsmaterials S_{3enz} ergab eine Inkubationszeit von 103 Tagen. Der dieser Zeit entsprechende Gehalt an Infektiosität wird als 100% definiert. Nach der Zentrifugation von S_{3enz} bei 22000 g ohne Detergenz findet man im Sediment (P₂₂) eine Inkubationszeit von 98 Tagen. Das entspricht einem Infektiositätsgehalt von 125% gegenüber weniger als 2% im Zentrifugationsüberstand (S₂₂). (Die 2% Infektiositätsgehalt im Zentrifugationsüberstand wurden durch Addition der Meßwerte für P₂₁₅ und S₂₁₅ bestimmt, da sich nach der hochtourigen Zentrifugation von S₂₂ die gesamte Infektiosität in diesen beiden Fraktionen befindet.)

Ohne Detergenz sedimentierte nahezu die gesamte Scrapie-Infektiosität bei 22000 g.

In der Gegenwart von Detergenz sind dagegen nur 15% der Infektiosität mit dem Sediment P₂₂ assoziiert, während der überwiegende Teil im Überstand gelöst bleibt. Nach der 215000 g Zentrifugation dieses Überstandes findet man einen Infektiositätsgehalt von 120% im Sediment (P₂₁₅) und weniger

als 1% im Überstand (S_{215}). Somit läßt sich die detergenzgelöste Infektiosität des Überstands (S_{22}) in einer 215000 g Zentrifugation fast vollständig wieder sedimentieren.

Der Vergleich des gesamten relativen Gehalts an Infektiosität der Fraktionen ohne Sarkosyl mit dem der Fraktionen in Gegenwart von Sarkosyl zeigt, daß die biologische Aktivität des Erregers durch das Detergenz nicht verändert wird.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden daher im Reinigungsgang nach der Enzymbehandlung der Überstand S_{3enz} bei 22000 g zentrifugiert und damit die Infektiosität sedimentiert. Dieses Sediment wurde mit Ultraschall und Detergenz gelöst und abermals bei 22000 g zentrifugiert, wobei diesmal die Infektiosität im Überstand gelöst blieb. Nach einer hochtourigen Zentrifugation bei 215000 g befand sich das Agens im Sediment (P_{215}), aus dem seine weitere Reinigung erfolgte.

5.1.1.4 Ultraschallbehandlung und Zentrifugation in salzhaltigem Puffer

Die Sedimente, aus denen die Scrapie-Infektiosität weiter gereinigt werden sollte (P_{22} und P_{215}), wurden mit Ultraschall gelöst. Diese Behandlung hat sich als zeitsparend bei der Auflösung der Sedimente und optimal für eine Feinverteilung schwer löslicher Stoffe erwiesen.

Wird Ultraschallenergie mit hoher Intensität auf eine Flüssigkeit übertragen, dann bilden sich unzählige winzige Bläschen mit sehr hoher Spannung, die sofort wieder implodieren. Durch diese pulsierende Wirkung (Kavitation) wird in Gegenwart von Detergenz vermutlich das hydrophobe Scrapie-Agens in Micellen eingeschlossen und nun bei der zweiten 22000 g Zentrifugation in Lösung gehalten.

Bei einer anschließenden Zentrifugation bei 215000 g bestand das Sediment P_{215} aus einem kleinen, bernsteinfarbenen inneren Sediment, das mit einer großen, weißen, lockeren Schicht bedeckt war. Da ich dieses weiße Sediment für Lipoprotein hielt, wurde eine zweite hochtourige Zentrifugation in Gegenwart von 10% NaCl und 0,1% Sarkosyl durchgeführt. Material mit einem geringen spezifischen Gewicht sollte in dieser Salzlösung nicht sedimentieren. Das Sediment P_{215} wurde mit Ultraschall gelöst, um aggregiertes Material zu dissoziieren. Durch intermittierendes Beschallen wurde eine Überhitzung vermieden.

Nach der Zentrifugation erschien das Sediment P_{215S} als klares, bernsteinfarbenes Sediment. Mit dem Überstand S_{215S} wurde eine diffuse, weißlich-trübe Bande an der Oberfläche verworfen. Diese Behandlung führte zu einer weiteren Reinigung des Sediments (siehe Tabelle 6).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten die Anwesenheit von Scrapie-assoziierten Fibrillen im P_{215S} , ähnlich denen, die zuerst von Merz et al. in ungereinigtem Material gefunden worden sind (79).

5.1.2 Berechnung der Teilchengröße im Sediment nach differentieller Zentrifugation

Der s-Wertbereich von Teilchen der Fraktion P_{215S} ist nach oben durch das nach 20 Minuten bei 22000 g abzentrifugierte und verworfene Sediment begrenzt. Die kleinsten Teilchen, die vorhanden sein können, werden nach 2,5 Stunden bei 215000 g noch abzentrifugiert, da nach der Ultraschallbehandlung des Sediments P_{215} wieder kleinmolekulares Material entstehen kann.

Nach der Berechnung der Gleichgewichtskonstante K kann man den s-Wert aus der Formel

$$s = \frac{K}{t}$$

berechnen (13). t = Zentrifugationszeit in Stunden.

$$K = \frac{\ln r_{\max} - \ln r_{\min}}{\omega^2} \times \frac{10^{13}}{3600} \quad \begin{array}{l} r = \text{Radius} \\ \omega = 0,10472 \times \text{rpm} \end{array}$$

Berechnung der oberen s-Wertgrenze:

$$S_{\max} = \frac{(\ln 10,5 - \ln 5) \cdot 10^{13}}{0,33 \cdot (0,10472 \cdot 16000)^2 \cdot 3600} \approx 2225$$

Berechnung der unteren s-Wertgrenze:

$$S_{\min} = \frac{(\ln 9,0 - \ln 3,7) \cdot 10^{13}}{2,5 \cdot (0,10472 \cdot 55000)^2 \cdot 3600} \approx 30$$

Das Sediment P_{215S} enthält demnach Partikel im Bereich von etwa 30-2200 s.

5.1.3 Verteilung der Scrapie-Infektiosität auf die verschiedenen Fraktionen der differentiellen Zentrifugation

Nach dem unter 5.1 schematisch dargestellten Aufarbeitungsschema wurden 9 Aufarbeitungen mit jeweils 5 Hirnen Scrapie-infizierter CLAC-Hamster durchgeführt. Die Messung der Inkubationszeiten der einzelnen Fraktionen erfolgte in Gruppen von je 5 Hamstern und ist in Tabelle 5 dargestellt.

Aus diesen gemessenen Inkubationszeiten konnte die Menge an Infektiosität abgeschätzt werden (siehe 4.1.10). Vergleiche zwischen den Fraktionen waren nur innerhalb eines Experimentes möglich, weil verschiedene Verdünnungen ausgetestet wurden. Die Infektiosität im Ausgangsmaterial (Homogenat) jedes Experiments wurde als 100% definiert.

Beispiel:

In Experiment 1 ist eine Verdünnung von 10^{-4} getestet. Für das Homogenat wurde eine Inkubationszeit von 93 ± 4 Tagen gefunden. In der letzten Fraktion P_{215} verlängerte sich die Inkubationszeit um 7 Tage auf 100 ± 3 Tage. Dieser Inkubationszeitverlängerung entspricht ein Infektiositätsverlust von etwa 75%. Somit sind ca. 25% der Ausgangsinfektiosität im P_{215} vorhanden.

Betrachtet man die Inkubationszeiten von Hirnhomogenaten nach Titration einer 10^{-2} Verdünnung (siehe Tab. 5, Exp. 3-8), findet man Werte zwischen 68 und 75 Tagen. Erweitert man diese Inkubationszeitdifferenz von 7 Tagen um die durchschnittliche Standardabweichung von ± 3 Tagen, so erhält man 13 Tage als maximale Differenz innerhalb der Homogenatfraktion. 13 Tage Inkubationszeitdifferenz entsprechen einem Titerunterschied von etwa einer Zehnerpotenz, ein Wert, der auch aus der Literatur bekannt ist (65, 99). Wegen der Ungenauigkeit dieses Verfahrens der Titerbestimmung wurde die Aufarbeitung mehrfach wiederholt.

Bei der Entwicklung des Trennungsganges durch differentielle Zentrifugation wurde immer die Fraktion mit der generell kürzeren Inkubationszeit weiter verarbeitet. Für diese Experimente waren sorgfältige Planung und viel Geduld erforderlich, da die Auswertung erst nach 4 Monaten erfolgen konnte.

Experiment Verdünnung	1 10^{-4}	2 10^{-3}	3 10^{-2}	4 10^{-2}	5 10^{-2}	6 10^{-2}	7 10^{-2}	8 10^{-2}	9 10^{-1}
<u>Fraktion</u>									
Homogenat (= 100%)									
S ₃	93 ± 4	82 ± 5	74 ± 5	72 ± 3	72 ± 2	75 ± 1	73 ± 1	68 ± 2	72 ± 3
P ₃	97 ± 5	87 ± 5	74 ± 5	78 ± 3			75 ± 5		
S _{3enz}			75 ± 5	73 ± 3			73 ± 5		
S ₂₂		85 ± 3	77 ± 3	76 ± 3			74 ± 3		
P ₂₂	> 120		89 ± 2	87 ± 2			92 ± 3		
S ₂₁₅	98 ± 0		79 ± 2	77 ± 0			83 ± 5		
P ₂₁₅	> 120	105 ± 0	92 ± 2	100 ± 1					
	100 ± 3 (25%)	91 ± 1 (20%)	79 ± 2 (40%)	79 ± 1 (25%)	86 ± 2 (10%)			76 ± 4	
S _{215S}							97 ± 1	126 ± 0	98 ± 7
P _{215S}						83 ± 4 (20%)	81 ± 6 (20%)	79 ± 4 (10%)	76 ± 3 (45%)

Tabelle 5

Inkubationszeit in Tagen (+ Standardabweichung) in verschiedenen Fraktionen des Reini-
gungsschemas. Zur Aufarbeitung der Fraktionen siehe Punkte 4.3.1 - 4.3.3. Unter den letz-
ten Fraktionen ist der Gehalt an Infektiosität im Vergleich zum Ausgangsmaterial angege-
ben.

Tabelle 5 zeigt, daß die Inkubationszeiten nach Inokulation von S_3 und P_3 gleich lang sind (Experimente 3, 4 und 7). Die Infektiosität ist demnach in beiden Fraktionen etwa gleich hoch. Bei der folgenden Zentrifugation mit 22000 g war die für den Überstand S_{22} bestimmte Inkubationszeit 10 Tage länger als die des Sediments P_{22} (Experimente 3, 4 und 7). Der Verlust an Infektiosität mit dem verworfenen Überstand betrug 15-20%.

In den letzten beiden hochtourigen Zentrifugationen bei 215000 g war die Inkubationszeitdifferenz zwischen den Überständen S_{215} oder S_{215S} und P_{215} oder P_{215S} 12 Tage, so daß weniger als 10% der Infektiosität mit dem Überstand verloren ging (Experimente 1-4 und 7-9).

Unabhängig von der getesteten Verdünnung wurde in den Fraktionen P_{215} und P_{215S} ungefähr 20% der im Ausgangsmaterial vorhandenen Infektiosität gefunden.

Es ist möglich, daß partiell gereinigtes Scrapie-Material anders titriert als ungereinigtes Hirnhomogenat (2). Um dies zu überprüfen, wurden zwei Proben partiell gereinigten Scrapie-Materials in einer 10^{-5} Verdünnung getestet. Eine der Proben wurde mit Puffer verdünnt, die andere mit einer 10^{-2} Verdünnung von Hirnhomogenat aus gesunden Hamstern. Die ermittelten Inkubationszeiten betrugen 104 ± 5 und 105 ± 1 Tage. Somit sind durch Inkubationszeitbestimmungen gemessene Infektiositätstiters in gereinigtem Material mit den in ungereinigtem Material gemessenen vergleichbar. Über eine ähnliche Untersuchung wurde 1981 berichtet (60).

5.1.4 Chemische Analysen und Reinigungsfaktoren

Die Reinigung der Scrapie-Infektiosität mit differentieller Zentrifugation wurde durch chemische Analysen von Protein, DNA und RNA überprüft. Die Analysen wurden zunächst mit Fraktionen aus normalen CLAC-Hamsterhirnen und dann mit Scrapie-Fraktionen durchgeführt. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen beiden Materialien gefunden. Deshalb habe ich die Daten zusammengefaßt und die Mittelwerte in Tabelle 6 dargestellt.

Die Durchführung der Proteinbestimmung im Ausgangshomogenat erfolgte mit Proben ohne Proteinase K und ergab Werte von etwa 100 mg Protein/g Hirn. Im Überstand der 3000 g Zentrifugation (S_3) wurden vor der Proteinase K Verdauung 50 mg Protein/g Hirn gefunden und nach Inaktivierung des Enzyms 37 mg/g. Weniger als die Hälfte des jetzt noch im Überstand vorhandenen Proteins sedimentierte bei der 22000 g Zentrifugation (P_{22}). In dieser Fraktion befanden sich ca. 14% des im Ausgangsmaterial bestimmten Proteingehalts. Nach Lösung des Sediments P_{22} mit Ultraschall in Gegenwart von Detergenz und nach erneuter Proteinase K-Verdauung enthielt das bei 215000 g abzentrifugierte Sediment P_{215} noch 290 µg Protein. Diese Fraktion wurde mit Hilfe von Ultraschall in Puffer mit 10% NaCl aufgenommen und nochmals hochtourig zentrifugiert.

Im resultierenden Sediment P_{215S} mit einem Gehalt von ca. 20% der Ausgangsinfektiosität befanden sich mit 16 µg Protein nur etwa 0,02% des im Ausgangsmaterial vorhandenen Proteins.

Fraktion	Gehalt $\pm$ Standardabweichung in mg/g Hirngewicht an		
	Protein	DNA	RNA
Homogenat (8)	105 $\pm$ 18 $\equiv$ 100%	2,04 $\pm$ 0,26 $\equiv$ 100%	1,75 $\pm$ 0,47 $\equiv$ 100%
S ₃ (5)	50 $\pm$ 7	-	-
S _{3enz} (5)	37 $\pm$ 4	-	-
P ₂₂ (7)	14 $\pm$ 4	-	-
P ₂₁₅ (7)	0,29 $\pm$ 0,08	0,009 $\pm$ 0,001	0,024 $\pm$ 0,014
P _{215S} (4)	0,016 $\pm$ 0,07	0,002 $\pm$ 0,001	0,015 $\pm$ 0,004
Ausbeute P _{215S} $\times$ 100 Homogenat	0,02%	0,1%	1%

Tabelle 6

Gehalt an Protein, DNA und RNA in Fraktionen aus Scrapie-
infizierten Hirnen von CLAC-Hamstern.

in Klammer: Zahl der Analysen

Das Hirnhomogenat enthielt etwa 2 mg DNA und 1,75 mg RNA/g
Hirn. Im Sediment P_{215S} wurden ca. 2 μ g DNA und 15 μ g RNA
gemessen, das sind ca. 0,1% bzw. 1% der ursprünglich vorhan-
denen Menge. Die Analysen der letzten Fraktionen wurden mit
Material aus 5 Hamsterhirnen durchgeführt.

Vergleicht man die Befunde, nach denen das Sediment P_{215S}
noch 20% der Ausgangsinfektiosität enthält (siehe Tabelle
5), mit dem relativen Gehalt an Protein und Nukleinsäuren
dieser Fraktion, lassen sich folgende Reinigungsfaktoren
errechnen:

Infektiosität zu Protein 1000

Infektiosität zu DNA 200

Infektiosität zu RNA 20

5.1.5 Stabilität der gereinigten Scrapie-Infektiosität in vitro

Das Sediment P_{215S} aus 5 Hirnen Scrapie-infizierter CLAC-Hamster wurde in 1 ml TBS mit 10% NaCl und 1% Zwittergent 3-14 mit Ultraschall gelöst. Eine 10⁻² Verdünnung dieses Materials wurde am Tag der Aufarbeitung titriert und die restliche Probe bei 4°C in einem Eppendorfgeläß gelagert.

2 bzw. 6 Monate nach der Aufarbeitung wurden nach Ultraschallbehandlung 10⁻² Verdünnungen getestet. Die ermittelten Inkubationszeiten betrugen:

79 ± 4 (Tag der Aufarbeitung)

82 ± 0 (2 Monate gelagert)

73 ± 1 (6 Monate gelagert)

Nach 6 Monaten Lagerung wurde eine Verkürzung der Inkubationszeit von 6 Tagen gegenüber dem sofort titrierten Material festgestellt. Diesem Unterschied in der Inkubationszeit entspricht ein Titerunterschied von einer halben Zehnerpotenz (siehe Abb. 1). Mit der Titerbestimmung durch Inkubationszeitvergleiche können jedoch Titerunterschiede zwischen Einzelproben von weniger als 10² LD₅₀ Einheiten nicht bestimmt werden (99). Daher ist die Beobachtung einer Erhöhung der Infektiosität des gereinigten Agens nach 6 Monaten Lagerung nicht signifikant.

Unter den beschriebenen Bedingungen können die Proben mindestens 6 Monate aufbewahrt werden, ohne daß ein meßbarer Verlust an Infektiosität auftritt.

5.2 Reinigung von Scrapie-Infektiosität durch Sedimentation in Sucrose- und CsCl-Gradienten

Nach der Anreicherung eines Virus werden seine chemischen und physikalischen Eigenschaften zur Gewinnung einer homogenen Virusfraktion benutzt. In den letzten Jahren ist dazu immer häufiger die Methode der Gradientenzentrifugation verwendet worden. Man kann diese Zentrifugation in zwei Arten einteilen: die Zonen-Sedimentation (Trennung nach Molekülform) und die isopyknische Zentrifugation (Trennung nach Dichte). Da es viele Spekulationen über Natur und Größe des Scrapie-Agens gibt, sollte mit dem Sedimentationsverhalten der Infektiosität untersucht werden, ob sich der Erreger wie ein Virus verhält.

5.2.1 Verhalten der Scrapie-Infektiosität in einem kombinierten Sedimentations- und Dichtelauf

Das Sediment P_{215S} aus 5 CLAC-Hamsterhirnen wurde auf einen sterilen Sucrosegradienten 5-20% aufgetragen (siehe 4.3.6.1). Ein Referenzgradient enthielt Rindersealbumin (Sedimentationskoeffizient 4s) und 30s und 50s Ribosomenuntereinheiten. Nach der Zentrifugation wurden acht Fraktionen durch Anstechen des Zentrifugenröhrchens von der Seite gesammelt und 10^{-2} Verdünnungen in Hamster inokuliert. Die Verteilung der Infektiosität wurde durch Inkubationszeitvergleiche bestimmt und ist in Abbildung 9 dargestellt.

Abbildung 9 zeigt, daß im Sediment (Fraktion 8) die kürzeste Inkubationszeit (76 ± 3 Tage) gemessen wurde. Dieser Fraktion mit der höchsten Infektiosität wurde ein relativer Infektiositätsindex von 100 zugeordnet. Fraktion 7, in der die nächstkürzeste Inkubationszeit (92 ± 0 Tage) gemessen wurde, hatte einen berechneten Infektiositätsindex von 5,

das heißt, einen Gehalt von nur 5% der Infektiosität von Fraktion 8. Aus Abbildung 9 kann man entnehmen, daß ca. 90% der Infektiosität sedimentiert sind.

Der Vergleich mit der Sedimentation der Referenzsubstanz zeigt, daß das Agens überwiegend einen Sedimentationskoeffizienten von größer als 80s aufweist. Teilchen, die nach dem ersten Sedimentationslauf noch im Sediment vorhanden sind, haben demnach ebenso wie viele Viren Sedimentationskoeffizienten von 80-2200s (siehe 5.1.2).

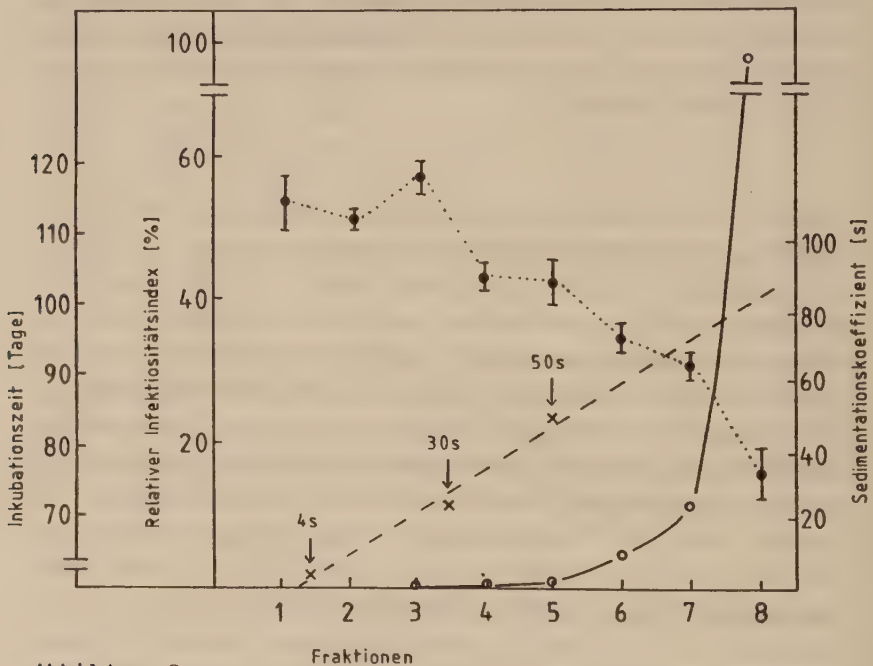


Abbildung 9

Sedimentation des Scrapie-Agens in einem Sucrosegradienten.

(.....) mittlere Inkubationszeit $\pm$ Standardabweichung,

(—) aus der Inkubationszeit berechneter relativer Infektiositätsindex,

(---) Sedimentationskoeffizienten der Referenzsubstanzen.

Bei einem Wiederholungsversuch wurde der Proteingehalt im Sucrosegradienten mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Dazu wurden nach der Zentrifugation 10 Fraktionen à 1 ml durch Anstechen von der Seite und das Sediment P_{SucrI} (Fraktion 11) gewonnen. Um die Sucrose zu entfernen und um später das gesamte Material einer Fraktion analysieren zu können, wurden die Fraktionen mit Puffer aufgefüllt, hochtourig zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Gefäßwände mit pro-ophta-Stäbchen getrocknet.

Die Sedimente der Fraktionen 1-10 waren bernsteinfarben, klein und meistens punktförmig verteilt. Das Sediment P_{SucrI} erschien braun-gelb, ringförmig und nach visueller Abschätzung etwa fünfmal so groß wie die Sedimente der anderen Fraktionen. Nach Zugabe von 20 μl Laemmli-Puffer und 10 Minuten im Wasserbad bei 100°C wurden die Sedimente gelelektrophoretisch untersucht (siehe Abb. 10).

Aus Abbildung 10 wird deutlich, daß in diesem kombinierten Dichtelauf Verunreinigungen mit niedriger Dichte und kleinmolekulare Verunreinigungen mit dem Überstand entfernt worden sind (besonders in den Fraktionen 2 und 3). Ferner läßt sich abschätzen, daß höchstens 20% des Gesamtproteins (Positionen 1-11) im Sediment (Position 11) gefunden werden. Die Infektiosität im Sediment P_{SucrI} beträgt jedoch mindestens 80% der Gesamtinfektiosität des Gradienten. Mit dieser Zentrifugation ist demnach nochmals eine etwa vierfache Reinigung der Scrapie-Infektiosität gegenüber dem $P_{215\text{S}}$ erreicht worden.

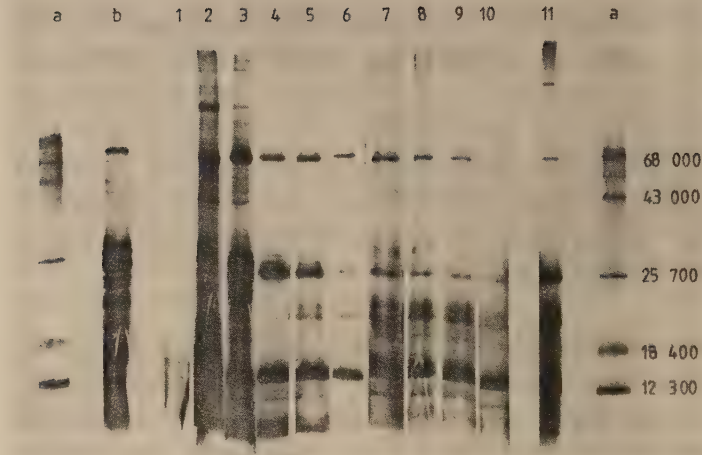


Abbildung 10

SDS-PAGE von Fraktionen aus einem kombinierten Sedimentations- und Dichtelauf. Die Abbildung zeigt die Analyse der Fraktionen 1-11 aus Scrapie-infizierten CLAC-Hamsterhirnen (11 = Sediment). An Position b ist das Proteinmuster des Gradienten-Auftragsmaterials (P_{215S}) zu sehen. Die Positionen a zeigen die Eichproteine Rinderserumalbumin (M_r 68000), Ovalbumin (M_r 43000), α -Chymotrypsinogen (M_r 25700), β -Lactoglobulin (M_r 18400) und Cytochrom c (M_r 12300). Gelkonzentration: 12-17%, Färbung mit Silber.

5.2.2 Verhalten der Scrapie-Infektiosität in einem Sucrose-Sedimentationslauf

Sedimente P_{SucrI} aus Hirnen von klinisch manifest Scrapie-erkrankten CLAC- und Aura-Hamstern und von Kontrolltieren wurden nach Entfernung der Sucrose und Behandlung mit Ultraschall auf einen neuen Sucrosegredienten mit gleichem Konzentrationsbereich wie vorher aufgetragen. Um das Agens nicht zu sedimentieren, wurden die Bedingungen so gewählt,

daß bekannte, nicht lipidhaltige Viren (50-300 s) innerhalb des Gradienten zu finden sein sollten. In der Kombination aufeinander folgender Gradienten-Zentrifugationen wird in der zweiten Zentrifugation eine Trennung nur nach unterschiedlicher Größe der sedimentierenden Teilchen erreicht.

Wie beim kombinierten Sedimentations- und Dichtelauf wurden 11 Fraktionen auf Scrapie-Infektiosität (siehe Tabelle 7) und mit SDS-PAGE (siehe Abb. 13) analysiert. Zur Abschätzung des Sedimentationskoeffizienten wurden Referenzsubstanzen (50 s Ribosomenuntereinheiten und Ø X 174 Phagen mit 115 s bei kompletten und 70 s bei leeren Partikeln) parallel zum Hirnmaterial zentrifugiert (siehe Abb. 11). Zusätzlich wurden die Fraktionen elektronenmikroskopisch untersucht (siehe Tabelle 7).

Die gewonnenen Fraktionen 1-10 enthielten 1 ml Gradientenlösung, Fraktion 11 (Sediment) wurde mit Puffer auf 1 ml gebracht. Nach Behandlung mit Ultraschall wurden 50 µl für die Elektronenmikroskopie verwendet. Den CLAC-Proben wurden 50 µl entnommen und mit PBS⁻ und Antibiotika auf 1 ml aufgefüllt. Von dieser Lösung wurden 50 µl in Gruppen von je drei CLAC-Hamstern inokuliert und die Inkubationszeit bestimmt. Der Rest der Fraktionen wurde auf 10 ml aufgefüllt und nach hochtouriger Zentrifugation die Sedimente für die Proteinanalyse verwendet.

Tabelle 7 zeigt, daß mit Ausnahme der obersten fraktion 1 in allen anderen fraktionen hohe Infektiositätstitere gefunden worden sind. Aus dem Vergleich mit den Positionen der Referenzsubstanzen (siehe Abb. 11) geht hervor, daß der überwiegende Teil der Infektiosität im Bereich von 70-300 s sedimentiert und sich damit wieder virusähnlich verhält.

Fraktion	Inkubationszeit (Tage $\pm$ Standard- abweichung)	Auftreten von Fibrillen
1 (oben)	101 $\pm$ 2	selten
2	93 $\pm$ 5	wenig
3	86 $\pm$ 0	viel
4	91 $\pm$ 5	viel
5	82 $\pm$ 6	viel
6	92 $\pm$ 5	viel
7	91 $\pm$ 1	viel
8	87 $\pm$ 2	viel
9	87 $\pm$ 2	viel
10	93 $\pm$ 3	wenig
11 (Sediment)	94 $\pm$ 2	Aggregate

Tabelle 7

Verteilung von Infektiosität (gemessen durch Inkubationszeitvergleiche) und Fibrillen nach Sedimentation der CLAC-Scrapie-Fraktion P_{SucrI} in einem zweiten Sucrosegradienten. Die Fibrillen wurden elektronenmikroskopisch nachgewiesen (siehe Abb. 12, Legende).

Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigte in den Gradientenfraktionen mit hoher Scrapie-Infektiosität eine große Anzahl von Fibrillen (siehe Abb. 12), die in den Fraktionen 3-9 am zahlreichsten waren (siehe Tab. 7). Diese Fibrillen bildeten mindestens 90% des sichtbaren Materials. In Fraktion 1, in der wenig Infektiosität gefunden wurde, wurden auch die wenigsten Fibrillen beobachtet. In Gradientenfraktionen aus Kontrolltieren traten keine Fibrillen auf.

Bei 40000-facher Vergrößerung war zu erkennen, daß die Fibrillen im allgemeinen aus 2-4 helikal verdrehten Filamenten von je 4-6 nm Durchmesser aufgebaut und etwa 50-300 nm lang waren. Sie schienen identisch mit den von Patricia Merz

et al. in Hirnextrakten Scrapie-infizierter Mäuse und Hamster entdeckten SAF zu sein (79). Ein Objektträgernetz mit den Fibrillen wurde zu P.Merz geschickt und die morphologischen Strukturen von ihr als SAF identifiziert.

Nach SDS-PAGE der Gradientenfraktionen waren auf den Gelen Banden zu sehen, von denen sich einige in ihrer Intensität zwischen Fraktionen aus Scrapie- und Normalhirn unterschieden (siehe Abb. 13). Unterschiede zeigten sich auch zwischen verschiedenen Fraktionen jedes Gradienten und zwischen verschiedenen Experimenten. Das meiste Material von Fraktion 7 aus Aura-Scrapie-Material ging während der Zentrifugation verloren, so daß an Position 7 das Gel keine Banden zeigt.

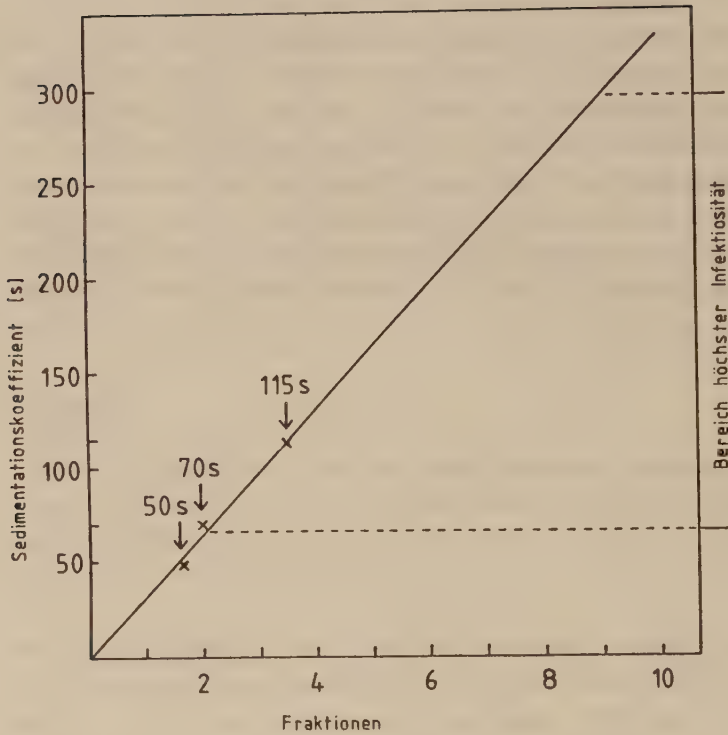


Abbildung 11

Sedimentation der Referenzsubstanzen 50 s Ribosomenuntereinheiten, 70 s leere und 115 s komplette Phagen und Sedimentation parallel dazu zentrifugierter Infektiosität in einem Sucrosegradienten. Die Linearität des Gradienten wurde refraktometrisch bestimmt.

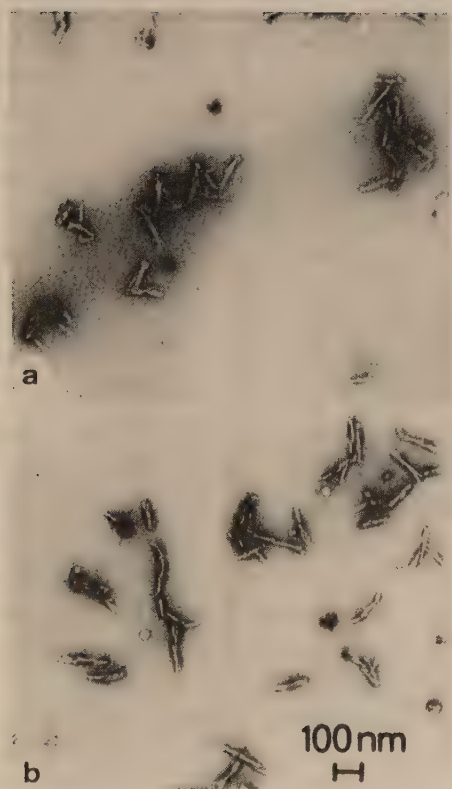


Abbildung 12

Elektronenmikroskopische Aufnahme von Proben aus Fraktion 6 (siehe Tab. 7) aus einem Sucrose-Sedimentationslauf von gereinigter Infektiosität aus Scrapie-erkrankten CLAC-Hamstern (a) und Aura-Hamstern (b).

Die Proben wurden auf kohlebeschichtete Kupfer-Objektträger-netze absorbiert und mit 1% wässrigem Uranylacetat negativ kontrastiert (45). Die dazu gehörende Proteinanalyse durch SDS-PAGE ist in Abbildung 11 zu sehen.

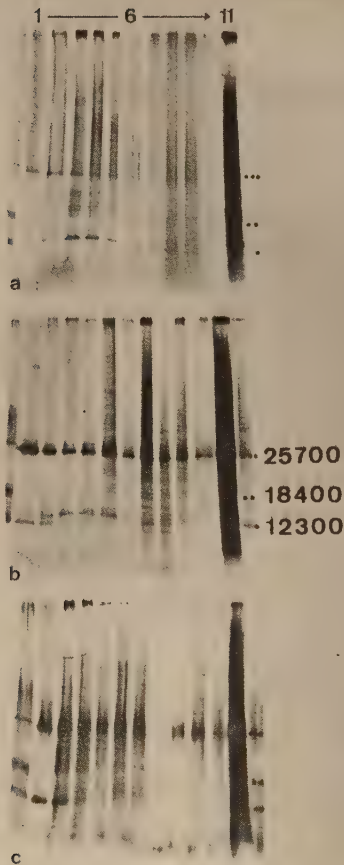


Abbildung 13

SDS-PAGE von Fraktionen aus einem Sucrose-Sedimentationslauf. Die Abbildung zeigt die Analyse der Fraktionen 1-11 aus nicht infizierten CLAC-Hamstern (a), Scrapie-infizierten CLAC-Hamstern (b) und Scrapie-infizierten Aura-Hamstern (c) (Fraktion 11 = Sediment). An den äußeren Positionen rechts und links sind die Eichproteine Cytochrom c (M_r 12300), β -Lactoglobulin (M_r 18400) und α -Chymotrypsinogen (M_r 25700) aufgetragen. Gelkonzentration: 12-17%, Färbung mit Silber.

Aus dem Experiment geht jedoch hervor, daß sich im Sediment der Gradienten ca. 90% des mit Silber anfärbbaren Materials befand (Positionen 11a-c). Die Infektiosität war dagegen größtenteils im Überstand lokalisiert (siehe Tab. 7), so daß eine weitere Reinigung des Agens erfolgte. Mit den beiden Sucrosegradienten erreicht man eine ca. zehnfache Anreicherung der Scrapie-Infektiosität gegenüber dem Sediment P_{215S}. Eine genaue Bestimmung der Reinigung setzt allerdings eine Endpunkttitration der Fraktionen und direkte Proteinbestimmungen voraus, da einerseits mit der Silberfärbung nicht alle Proteine gleich stark gefärbt werden (93) und andererseits das gereinigte Material eine gegenüber dem Homogenat veränderte Infektiosität haben könnte (2).

Ein weiteres, auch in anderen Experimenten gefundenes Resultat ist eine Proteinbande, die in Höhe der Bande von α -Chymotrypsinogen auftritt, was auf ein Molekulargewicht von etwa 26000 Dalton deutet. Diese Bande ist in den Fraktionen 1-10 erkennbar und bei Material aus Scrapie-infizierten Hirnen deutlich stärker ausgeprägt als bei Material aus Kontrolltieren. Da bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen in den Fraktionen 3-9 viele Fibrillen gefunden worden sind, die in einigen Fraktionen mehr als 80% des im Elektronenmikroskop sichtbaren Materials ausmachten (siehe Tab. 7), kann man annehmen, daß das Material der 26000 M_r Bande den Hauptbestandteil der Fibrillen darstellt.

5.2.3 Verhalten der Scrapie-Infektiosität in einem CsCl-Gradienten

Die isopyknische Zentrifugation stellt eine verbreitete Technik in der Virusisolation dar. Sie wird zur Trennung von Teilchen verwendet, die sich in ihrer Dichte, nicht jedoch in ihrer Größe unterscheiden. Mit ungereinigtem Scrapie-

Material vorgenommene Gleichgewichtszentrifugationen führten nicht zu eindeutigen Ergebnissen. Von verschiedenen Autoren wurden für die Infektiosität Dichten von 1,1 bis 1,35 g/ml ermittelt (101). Die Infektiosität ließ sich nicht scharf banden.

Hochgereinigtes Material P(E)II aus 5 Hirnen gesunder und Scrapie-erkrankter Aura-Hamster wurde auf einen CsCl-Gradienten aufgetragen. Nach der Zentrifugation war sowohl bei Material aus Normalhirnen als auch bei Material aus infizierten Hirnen eine schwache, diffuse Bande an der Grenzfläche von Auftragsflüssigkeit und CsCl-Gradient sichtbar, die mit der ersten Fraktion abgesaugt wurde. Beide Gradienten zeigten eine zweite, weiß-trübe Bande unterhalb der Mitte, die bei Normalmaterial mit der 6.Fraktion, bei Scrapie-Material mit der 7.Fraktion abgezogen wurde. Die Bande war im Scrapiegradienten stärker ausgeprägt als im Normalgradienten. Um das winzige, hell-braune Sediment untersuchen zu können, wurde der Überstand in 10 Fraktionen durch Anstechen von der Seite entnommen und das Sediment (Fraktion 11) mit Ultraschall in TBS gelöst.

Aus Tabelle 8 kann man entnehmen, daß die höchste Infektiosität in den Fraktionen 1, 6 und 7 gefunden wurde. Die nicht in den Gradienten eingewanderte Infektiosität in Fraktion 1 kann mit einer Absorption des hydrophoben Agens an leichte Lipide oder Lipoproteine erklärt werden. Durch eine derartige Absorption könnte auch der elektronenmikroskopische Nachweis der Fibrillen erschwert sein, so daß in dieser Fraktion nur wenig SAF gefunden wurden. In den Fraktionen 6 und 7, in denen sich die meiste Infektiosität des Gradienten befand, wurden auch die meisten Fibrillen gefunden. Die mittlere Dichte dieser Fraktionen lag mit etwa 1,35 g/ml in dem Bereich von 1,29 bis 1,37 g/ml, in dem die höchste Infektio-

sität für ungereinigtes Material beschrieben worden ist (46).

Fraktion	Inkubationszeit (Tage $\pm$ Standard- abweichung)	Dichte (g/ml)	Fibrillen
1 (oben)	81 $\pm$ 6	1,184	wenig
2	97 $\pm$ 4	1,206	keine
3	112 $\pm$ 13	1,239	selten
4	104 $\pm$ 11	1,274	keine
5	100 $\pm$ 12	1,311	keine
6	86 $\pm$ 2	1,336	viel
7	83 $\pm$ 4	1,377	wenig
8	100 $\pm$ 11	1,420	keine
9	104 $\pm$ 8	1,450	keine
10	95 $\pm$ 2	1,497	keine
11 (Sediment)	94 $\pm$ 5	-	wenig

Tabelle 8

Verteilung von Infektiosität (gemessen durch Inkubationszeitvergleiche einer 10^{-2} Verdünnung) und Fibrillen nach isopyknischer Zentrifugation der Aura-Scrapie-Fraktion P(E)II in einem CsCl-Gradienten. Die Fibrillen wurden elektronenmikroskopisch nachgewiesen (siehe Abb. 12, Legende), die Dichten refraktometrisch bestimmt.

Alle Fraktionen der Gradienten mit Normal- und Scrapiematerial wurden mit SDS-PAGE analysiert (siehe Abb. 14).

Das meiste mit Silber anfärbbare Material wurde in den Fraktionen, in denen im Gradienten sichtbare Banden zu sehen waren, gefunden. Bei Material aus infizierten Hirnen waren das die Fraktionen 1 und 6 (aufgetragen in den Positionen 1 und 6) und bei Normalmaterial Fraktion 7 (aufgetragen in Position 7). Der Vergleich der Gele zeigt bei Scrapiemate-

rial in allen Fraktionen ein Protein von M_r 26000, das bei Normalmaterial nicht vorkommt. Die Hauptmenge dieses Proteins wurde in der überfärbten Fraktion 6 gefunden.

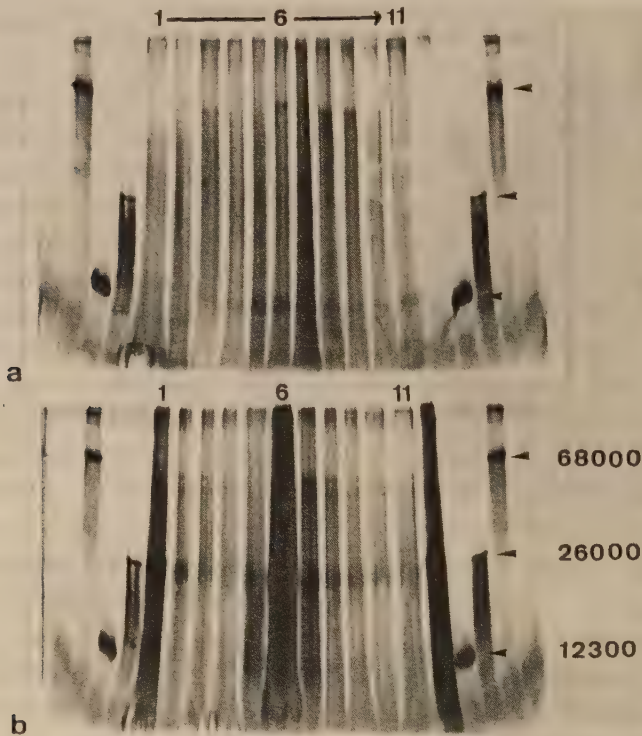


Abbildung 14

SDS-PAGE von Fraktionen eines CsCl-Gradienten. Die Abbildung zeigt die Analyse der Fraktionen 1-11 aus nicht infizierten Aura-Hamstern (a) und Scrapie-infizierten Aura-Hamstern (b), Fraktion 11 = Sediment. An den äußeren Positionen rechts und links sind die Eichproteine Cytochrom c (M_r 12300), Chymotrypsinogen A (M_r 26000) und Rinderserumalbumin (M_r 68000) aufgetragen. Position 12 zeigt die Analyse einer 1:10 Verdünnung von Fraktion 7 in (a) und Fraktion 6 in (b). Gelkonzentration 12-17%, Färbung mit Silber.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Ergebnisse der CsCl-Gradientenzentrifugation mit denen der Sucrosegradientenzentrifugation übereinstimmen: die größte Infektiosität wird in Fraktionen mit viel Fibrillen gefunden, die vermutlich aus Proteinuntereinheiten mit M_r 26000 bestehen (SAF-Protein) und eine Dichte von 1,35 g/ml haben.

5.3 Schnelle und effiziente Anreicherung von SAF-Protein

Statt aus Hirnhomogenat wurde das SAF-Protein aus detergenten-
gelösten Hamsterhirnen isoliert und dadurch die Effektivität
der SAF-Extraktion erhöht (siehe 4.3.4 und Abb. 15). Im
Verlauf der Aufarbeitung benutzte ich die hydrophoben Eigen-
schaften der Scrapie-Infektiosität und die Tendenz von SAF
zu aggregieren, um das Agens zu reinigen. Die Isolierung der
Infektiosität aus detergenten-
gelösten Hirnen und die an-
schließende Röhrextraktion (siehe Abb. 17) führten zu einem
einfachen und schnellen Aufarbeitungsgang.

Eine leicht modifizierte Kombination vom Aufarbeitungsschema
zur Reinigung von Infektiosität aus infizierten Hirnen
(siehe Abb. 8) und der Röhrextraktion (siehe Abb. 17) führte
zu relativ sauberen, intakten SAF. Dazu wurde der Hirnex-
trakt 10 Minuten bei 500 g (anstatt 3000 g) zentrifugiert.
Der Überstand wurde ohne Enzymbehandlung bis zum Sediment
 P_{215S} weiterverarbeitet.

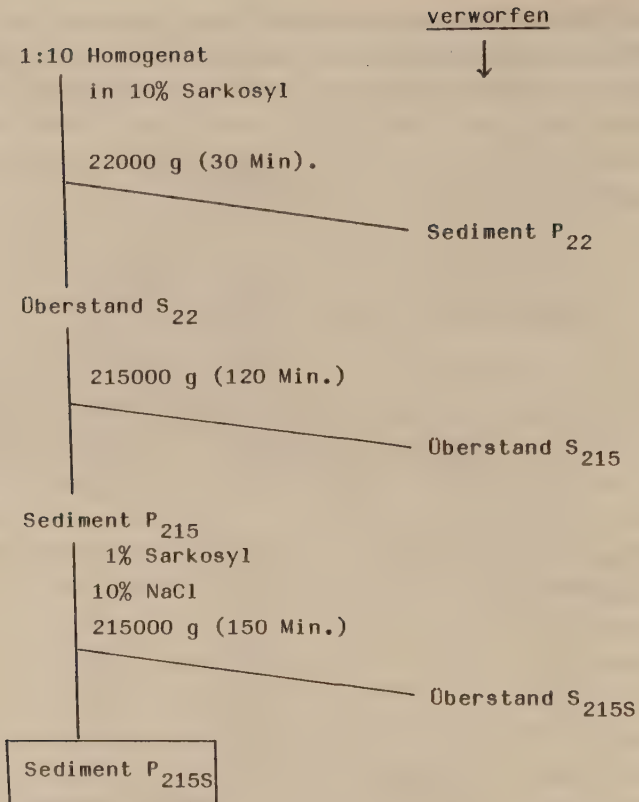


Abbildung 15

Schema zur partiellen Reinigung von Scrapie-Infektiosität aus mit Detergenz homogenisierten Hirnen erkrankter Hamster. (Details siehe Material und Methoden)

Der Proteingehalt von Fraktionen aus dem Schema zur Anreicherung von SAF-Protein und von Fraktionen der anschließenden Rührextraktion wurde mit SDS-PAGE analysiert. Das Ergebnis für eine Aufarbeitung von 5 infizierten und 5 Kontrollhirnen aus Aura-Hamstern zeigt Abbildung 16.

Im Coomassie Brilliant Blue gefärbten Gel waren bei einem Auftrag von 0,001 Hirnäquivalenten der Fraktionen detergenzgelöstes Homogenat (H) und 22000 g Überstand (S_{22}) keine Unterschiede zwischen den Banden aus Scrapie- und Normalhirn zu erkennen. Der Proteingehalt dieser Fraktionen war mit 100 µg/ml so hoch, daß mit der empfindlicheren Silberfärbung das Gel überfärbt wurde; daher sind keine Einzelbanden zu erkennen.

Obwohl von den Fraktionen P_{215} und P_{215S} eine gegenüber den Fraktionen H und S_{22} 50-fach konzentrierte Probe bezogen auf Hirnäquivalente (bre) aufgetragen worden ist, ist die Gelfärbung und damit der Proteingehalt der aufgetragenen Probe geringer. Erneut waren keine Unterschiede zwischen Material aus gesunden und infizierten Hirnen erkennbar. Aus dem Vergleich der Positionen P_{215} und P_{215S} erkennt man, daß die Zentrifugation im salzhaltigen Puffer den Proteingehalt im P_{215S} erheblich vermindert. Es läßt sich abschätzen, daß in Position H (0,001 bre) etwa 50 mal so viel Protein wie in Position P_{215S} (0,05 bre) angefärbt ist, insgesamt also der Proteingehalt pro Hirnäquivalent im Homogenat ca. 2500 mal so hoch ist, wie im Sediment P_{215S} . Anders ausgedrückt: es befinden sich 0,04% des im Ausgangsmaterial vorhandenen Proteins im Sediment P_{215S} aus detergenzgelöstem Hirnhomogenat. Berücksichtigt man die Ungenauigkeit der visuellen Abschätzung des Proteingehalts aus der Gelfärbung, kann man sagen, daß dieser Wert mit dem durch chemische Analysen von P_{215S} gefundenen Wert von 0,02% gut übereinstimmt (siehe 5.1.4). Die Titerbestimmung durch Inkubationszeitvergleiche ergab, daß ca. 20% der Ausgangsinfektiosität im Sediment P_{215S} aus detergenzgelöstem Hirnhomogenat vorhanden waren. Der Titer dieser Fraktion war demnach etwa so hoch, wie der im Sediment P_{215S} aus enzymbehandeltem Hirnhomogenat (siehe 5.1.3).

Es ist selbst nach Detergenz- und Ultraschallbehandlung schwierig, die durch differentielle Zentrifugation isolierten SAF in Lösung zu halten, da sie leicht aggregieren. Deshalb erschien es denkbar, daß kontaminierendes Material durch Extraktion mit Puffer entfernt werden könnte. Die Sedimente P₂₁₅ oder P_{215S} wurden darum wiederholt mit kleinen Volumina Puffer gerührt und das ungelöste Material nidentourig abzentrifugiert. Die Analyse des Proteingehalts im Sediment P(E)I und im Überstand (Pufferextrakt) erfolgte mit SDS-PAGE (siehe Abb. 16). Anzahl und Struktur von SAF wurden elektronenmikroskopisch überprüft und die Infektiosität durch Inkubationszeitvergleiche bestimmt (siehe Tab. 9).

Die Positionen E₁ in Abbildung 16 zeigen, daß der größte Teil des Proteins aus dem Sediment P_{215S} in einem einzigen Schritt extrahiert werden konnte. Zwischen den Banden von Normalhirn- und Scrapiehirnextrakten war kein Unterschied zu erkennen. (Identische Extraktionen lösten nicht wesentlich mehr Material.)

In dem extrahierten Sediment zeigte die Gelanalyse eine zusätzliche Bande bei Scrapiematerial, die bei Normalmaterial nicht auftrat (Positionen P(E)I). Dieses Material wurde 2 Stunden bei 37°C mit Extraktionspuffer und 5 µg Proteinase K/ml gerührt. In der folgenden Gelanalyse war im Coomassie Brillant Blue gefärbten Gel nur die schwache Bande von SAF-Protein und keine Bande im Material aus Normalhirnen (Positionen P(E)II) zu erkennen. Die Silberfärbung zeigte eine dicke SAF-Proteinbande von etwa 26000 Dalton und nur geringe Verunreinigungen. Die SAF-Proteinbande fehlte bei Material aus Normalhirnen.

Normalerweise wurden alle auf Gele aufgetragenen Proben mit Mercaptoäthanol (im Laemmli-Puffer) behandelt, um durch Disulfidbrücken zusammengehaltene Untereinheiten zu dissoziieren. Das Sediment P(E)IIa wurde ohne ein Reduktionsmittel

auf das Gel aufgetragen. Trotzdem wanderte das SAF-Protein bis zur gleichen Stelle wie vorher. Daraus kann man schließen, daß SAF keine Disulfid-Bindungen aufweist, also in vivo in der monomeren Form vorliegt.

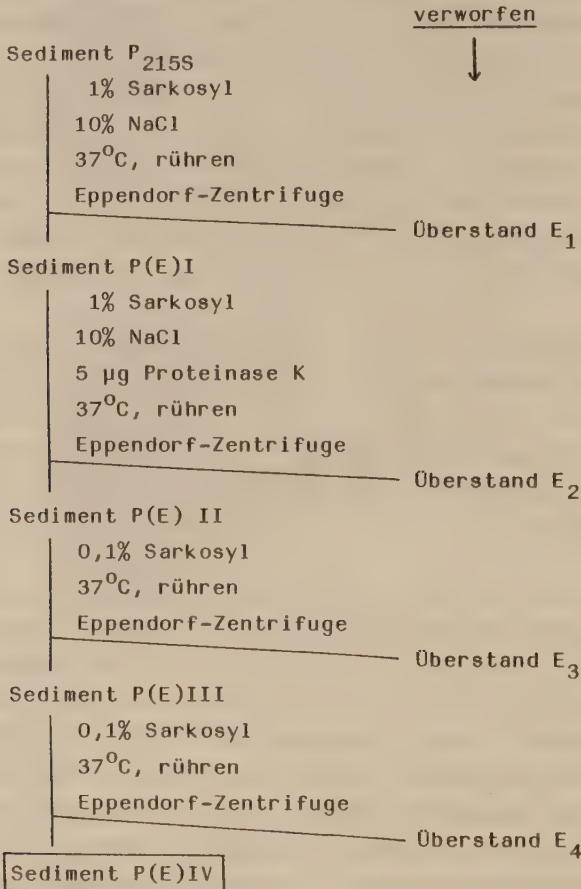


Abbildung 17

Röhrextraktion vom Sediment P_{215S} zur weiteren Reinigung der Scrapie-Infektiosität von kontaminierenden Proteinen (Extraktionen E₁ und E₂) und von wasserlöslichen Nukleinsäuren (Extraktionen E₃ und E₄). (Details siehe Material und Methoden.)

Um zu untersuchen, ob Infektiosität und SAF durch die Extraktion im Überstand gelöst werden oder zusammen mit dem 26000 Dalton-Protein sedimentieren, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen und Titrationsen durchgeführt. Die Elektronenmikroskopie zeigte, daß nahezu alle SAF ungelöst im Sediment P(E)II vorlagen. Die dichte Struktur von Fibrillen und Filamenten erschien nach Aufarbeitung aus detergenten-gelösten Hirnen durch Detergenzanlagerung aufgelockert. Die Infektiosität im extrahierten Sediment, gemessen durch Inkubationszeitvergleiche, wurde durch diese Strukturänderung nicht vermindert (siehe Tab. 9).

Fraktion	Inkubationszeit (Tage $\pm$ Standardabweichung)	
	CLAC-Hamster	Aura-Hamster
E _{1a}	103 $\pm$ 9	88 $\pm$ 2
E _{1b}	106 $\pm$ 7	90 $\pm$ 1
E _{1c}	-	94 $\pm$ 3
E _{1d}	-	93 $\pm$ 2
P(E)I	84 $\pm$ 0	70 $\pm$ 1

Tabelle 9

Inkubationszeiten von Überständen (E_{1a}-E_{1d}) und dem letzten Sediment (P(E)I) nach wiederholter Röhrextraktion (siehe Abb. 17) der durch differentielle Zentrifugationen gereinigten Infektiosität. Details siehe Text.

Aus Tabelle 9 kann man sehen, daß die Inkubationszeitverlängerung der Extrakte E_{1a}-E_{1d} gegenüber dem extrahierten Sediment mindestens 18 Tage betrug. Somit waren weniger als 5% der Infektiosität im Überstand gelöst. Fast die gesamte Infektiosität trat wieder zusammen mit SAF und SAF-Protein auf.

Chemische Analysen der Perchlorsäureextrakte von P(E)II zeigten, daß in den Sedimenten ca. 1 mg Nukleinsäure pro Hirnäquivalent vorhanden ist, wenn das Ausgangsmaterial entweder aus einer Aufarbeitung von detergenzgelöstem Hirnhomogenat oder einer Aufarbeitung mit 1. Differentialzentrifugation bei 500 g stammt. Beginnt dagegen die Reinigung der Scrapie-Infektiosität aus Hirnhomogenat mit einer Differentialzentrifugation bei 3000 g (siehe Abb. 8), findet man im Sediment P_{215S} einen geringeren Nukleinsäuregehalt (siehe Tab. 5). Offenbar werden Nukleinsäuren aus dem Kern mit dem verworfenen Sediment P_3 abgetrennt.

Eine effektive Reinigung des Sediments P(E)II von eventuellen Nukleinsäure-Kontaminationen war durch zweimalige Extraktion mit 0,1% Sarkosyl in bidest. Wasser möglich. Der Nukleinsäuregehalt konnte dadurch auf ca. 0,5 µg DNA und etwa 5 µg RNA pro Hirnäquivalent im Sediment P(E)IV reduziert werden. In den meisten Analysen war nach der Nukleinsäureextraktion der RNA-Gehalt in Proben aus Scrapie-infizierten Hirnen höher, als bei Material aus Kontrollhirnen (bis zu 50%). Dieser Befund war wegen der hohen Meßungenauigkeit nicht signifikant.

6. DISKUSSION

6.1 Reinigung des Scrapie-Agens durch differentielle Zentrifugation

Ziel der vorliegenden Arbeit war, das Scrapie-Agens zu reinigen. Dazu wurde aufbauend auf bekannten Arbeiten (95, 97) ein Trennungsgang entwickelt. Unter den hier beschriebenen Versuchsbedingungen wird eine schnelle und effektive Anreicherung des Agens aus Hamsterhirnen mit einfachen Differentialzentrifugationen erreicht.

Zu Beginn der Aufarbeitung wurden die Hirne in Anwesenheit von Proteinase K homogenisiert, um eine erhöhte Freisetzung von Infektiosität aus dem Hirnmaterial zu gewähren. Eine Inaktivierung des Scrapie-Agens in ungereinigtem Material erfolgt nicht, da vorsichtshalber nur ein Zehntel der Proteinase K-Konzentration eingesetzt wird, die bei 37°C die Scrapie-Aktivität in partiell gereinigtem Material herabsetzt. Das zur Inaktivierung der Proteinase K verwendete PMSF wird in der niedrigsten noch wirksamen Konzentration benutzt, um eventuelle Nebenwirkungen auf die Infektiosität möglichst gering zu halten. Die anschließende Nucleaseverdauung wirtseigener Nukleinsäuren beeinflusst die Scrapie-Infektiosität nicht, da das Agens noch membrangebunden und somit eine eventuell vorhandene Scrapie-spezifische Nukleinsäure nicht angreifbar ist. Nach der Nucleaseverdauung wird erneut eine Proteinase K-Behandlung vorgenommen, bei der Proteine, die vorher durch Nukleinsäuren geschützt waren, abgebaut werden. Weil mit zunehmender Reinigung die Empfindlichkeit des Scrapie-Erregers gegen Proteinase K steigt, wurde bei der zweiten Behandlung eine geringere Enzymkonzentration als bei der Behandlung des Hirnhomogenats gewählt. Für die Isolierung und Lösung von Membranproteinen wurden bisher entweder anionische oder nichtionische Detergentien

verwendet. Während anionische Detergentien oft die biologische Aktivität der gelösten Proteine zerstören, haben nicht-ionische Detergentien ein geringes Lösungsvermögen. Bisherige Untersuchungen haben ergeben, daß zwitterionische Detergentien die biologische Aktivität gelöster Proteine nicht beeinflussen und daß sie nichtionischen Detergentien im Lösungsvermögen überlegen sind. Die biologische Aktivität des Scrapie-Agens wird durch SDS zerstört, nicht jedoch durch das ebenfalls anionische Detergenz Sarkosyl, das wegen seines guten Lösungsvermögens für die Isolierung des Erregers aus Membranfraktionen verwendet wurde. Um Versuchsergebnisse mit denen anderer Gruppen vergleichen zu können, wurde auch das zwitterionische Detergenz Z 3-14 benutzt, um das Agens in Lösung zu halten.

Vor der Detergenzbehandlung wird das infektiöse Agens bei 22000 g abzentrifugiert. Bei dieser Zentrifugation bleibt Material im Überstand, das bei sofortiger 215000 g Zentrifugation sedimentiert wäre. Die letzte hochtourige Zentrifugation in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen führt zur Abtrennung von Proteinen niedriger Dichte (wahrscheinlich Lipoproteinen). Durch Beeinflussung von Ionenbindungen könnten auch einige hochmolekulare Proteinkomplexe dissoziiert worden sein.

Der relative Infektiositätsgehalt der Fraktionen wurde durch Inkubationszeitvergleiche jeweils einer einzigen Verdünnung in Gruppen von 3-5 Hamstern bestimmt. Als Referenz diente dabei die Beziehung zwischen der Anzahl intracerebral injizierter infektiöser Einheiten und der mittleren Inkubationszeit der infizierten Tiere (siehe Abb. 1). Diese Art der Bestimmung setzt voraus, daß die Dosis-Wirkungskurve verschiedener Fraktionen unabhängig von ihrer Reinigung und der Aufarbeitungsmethode ist. Wiederholte Vergleiche der Verteilung der relativen Scrapie-Infektiosität verschiedener

Fraktionen zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit (siehe Tab. 5). Durch einmalige Inkubationszeitvergleiche einer Gruppe von 3-5 Tieren können jedoch Titerunterschiede von weniger als 2 Zehnerpotenzen nicht mehr exakt bestimmt werden (99).

Im klinischen Stadium der Erkrankung enthielt unser CLAC-Hamsterstamm, der zur Entwicklung des Reinigungsschemas bis zum Sediment P_{215S} verwendet wurde, 10-fach weniger Infektiosität als in anderen Inzuchtstämmen oder in nicht ingezüchteten Hamstern von anderen Autoren gefunden worden ist. Die Inokulation von unserem Ausgangsstamm 263 K in nicht ingezüchtete Aura-Hamster ergab dort ebenfalls höhere Titer (nicht beschrieben).

Auch die Pathogenese der Scrapie-Erkrankung in CLAC-Hamstern ist im Vergleich zu anderen Hamstern unterschiedlich. Einige Experimente nach Inokulation von niedrigen Agens-Dosen haben gezeigt, daß CLAC-Hamster erst 210 Tage nach der Infektion erkranken, einem bisher für andere Hamster nicht beschriebenen Zeitraum. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß wie bei der Transmission zwischen Schaf und Maus wirtsbedingte genetische Faktoren die Pathogenese beeinflussen (64).

Im Sediment P_{215S} haben wir eine etwa 1000-fache Reinigung der Scrapie-Infektiosität im Vergleich zum Proteingehalt erreicht. Berücksichtigt man die Ungenauigkeit des Testsystems, kann man mindestens von einer etwa 100- bis 1000-fachen Reinigung ausgehen. In der Literatur wird nach 3-5 Differentialzentrifugationen eine 5- bis 10-fache Reinigung in Bezug auf Protein angegeben (95, 96). Eine 100- bis 1000-fache Anreicherung wurde bisher nur nach vier Differentialzentrifugationen, Ammoniumsulfatpräzipitation und präparativer Gelelektrophorese erreicht (98). Der beschriebene Anreicherungsgrad ist damit vergleichbar mit den hier vorgestellten

ten Ergebnissen. Es werden aber keine Angaben über die Ausbeute (% der Ausgangsinfektiosität) gemacht, die vermutlich weit unter der in dieser Arbeit angegebenen Ausbeute liegt, weil für eine einzige Aufarbeitung 200 Hamsterhirne verwendet werden mußten.

Bezogen auf den RNA- und DNA-Gehalt im Sediment P_{215S} finden wir eine 20- bzw. 200-fache Anreicherung der Infektiosität. Ähnliche Werte sind in früheren Veröffentlichungen angegeben (95). Verglichen mit dem Proteingehalt im Gehirn ist der Nukleinsäuregehalt etwa 50-fach niedriger. Im Sediment P_{215S} findet man gleiche Teile Nukleinsäure und Protein. Der Nukleinsäuregehalt dieser Fraktion ist allerdings so gering, daß die chemischen Analysen an der Grenze der Nachweisbarkeit liegen und somit die Genauigkeit der Bestimmungen eingeschränkt ist.

Nach Proteinanalyse mit SDS-PAGE konnte im Sediment P_{215S} keine Scrapie-spezifische Bande gefunden werden. Mit dem Elektronenmikroskop wurde in dieser Fraktion bereits die Anwesenheit von fibrillären Strukturen nachgewiesen, die sich bei weiterer Reinigung als SAF erwiesen.

6.2 Isolation und Eigenschaften von Scrapie-assoziierten Fibrillen

In einer 1982 veröffentlichten Untersuchung wurde für das Scrapie-Agens mit einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie ein Molekulargewicht von nur 50000 gefunden (100). Aus weiteren Veröffentlichungen geht hervor, daß ein Protein für die Infektiosität erforderlich ist (97). Zur Erklärung dieser Befunde wurde vorgeschlagen, daß bei der geringen Größe des Scrapie-Agens nur eine kleine oder gar keine Scrapie-spezifische Nukleinsäure vorhanden ist (100). Ein derartiges

infektiöses Protein ohne Nukleinsäure (genannt Prion = pro-
teinacious infectious particle) ist in der Biologie bisher
nicht bekannt.

In einer Wiederholung der Hochdruckflüssigkeitschromatographie unter gleichen Bedingungen konnte gezeigt werden, daß die Molekularsiebchromatographie von einer Absorptionschromatographie überlagert war und deshalb für die Scrapie-Infektiosität ein falscher Wert gefunden worden ist (24). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß für die ungewöhnliche chemische und Hitzeresistenz des Scrapie-Agens nur eine kleine Subpopulation verantwortlich ist und daß im Hirnhomogenat suspendierte Viren ein Scrapie-ähnliches Inaktivierungsverhalten zeigen (104). Aus Bestrahlungsexperimenten geht hervor, daß der Erreger größer als das kleinste bekannte DNA-Einzelstrangvirus ist (103, 112). Diese Befunde deuten auf ein kleines Virus als Erreger der Scrapie-Krankheit.

Um die Größe des Erregers abschätzen zu können, wurde das Molekulargewicht in Gegenwart von Zwittergent über Sedimentationsanalyse in einem Sucrosegredient bestimmt. Bei einem postulierten Molekulargewicht von nur 50000 Dalton hätte die Scrapie-Infektiosität ein ähnliches Sedimentationsverhalten wie die Referenzsubstanz Rinderserumalbumin zeigen müssen, die am Anfang des Gradienten gefunden wurde (siehe Abb. 9). Der überwiegende Teil der Infektiosität sedimentierte jedoch im Bereich von 70-300s (siehe Abb. 11). Dieser Sedimentationsbereich schließt die Werte kleiner animalischer Viren (Parvoviren, Picornaviren, Papovaviren) und Pflanzenviren ein (Tabakmosaikvirus $s = 190$) und spricht nicht gegen das Vorhandensein einer Nukleinsäure. Weil das Scrapie-Agens Eigenschaften eines Erregers mit eigener kodierter Information besitzt, sollte man vom Vorhandensein einer Scrapie-spezifischen Nukleinsäure ausgehen.

Viele Viren lassen sich in einer Gleichgewichtszentrifugation reinigen. Versuche, den Scrapie-Erreger mit dieser Technik zu isolieren, waren nicht erfolgreich. Der Erreger verhielt sich nicht wie ein homogenes Teilchen und die Infektiosität wurde - zum Teil mit Wirtsmaterial assoziiert - über einen großen Bereich gefunden.

In der von uns mit gereinigtem Material durchgeführten CsCl-Dichtegradientenzentrifugation wurde die maximale Infektiosität in einem relativ engen Bereich mit einer Dichte von 1,35 g/ml gefunden, in dem auch die meisten Fibrillen auftraten (siehe Tab. 8). Falls die Infektiosität bei dieser Dichte vom Erreger ohne oder mit geringfügigen Verunreinigungen repräsentiert wird, wäre der Erreger zu leicht, um eine nackte Nukleinsäure zu sein, wie in vielen Hypothesen behauptet worden ist. Andererseits wäre das Agens dann zu dicht, um eine Lipidhülle zu enthalten oder mit wirtsspezifischen Membranlipiden assoziiert zu sein.

Sowohl in infiziertem als auch in Kontrollmaterial wurde nach Zentrifugation durch CsCl eine sichtbare Bande gefunden, die aber bei Kontrollmaterial etwas leichter war als bei Scrapie-Material. Daraus kann man schließen, daß der Erreger trotz hoher Reinigung noch mit Wirtsmaterial assoziiert ist.

Diese Annahme wird durch die Proteinanalyse der mittleren Gradientenfraktionen unterstützt, bei der sowohl das Material aus gesunden als auch das Material aus infizierten Hirnen über den ganzen erfaßten Molekulargewichtsbereich einen kontinuierlichen Gehalt an silberfärbbarem Material erkennen lassen (siehe Abb. 14). Diese Verunreinigungen waren wahrscheinlich Nukleoproteine im aufgetragenen Sediment P(E)I, die später mit der weiter entwickelten Extraktionsmethode durch Proteinase K Verdauung und Extraktion der

Nukleinsäuren bei geringer Ionenstärke entfernt werden konnten.

Wie bei der CsCl Dichtegradienten-Zentrifugation wurden bei der Sedimentationsanalyse im Sucrosegradienten in den Fraktionen mit hoher Infektiosität gleichzeitig die meisten Fibrillen gefunden (siehe Tab. 7) und als die von P.Merz entdeckten SAF identifiziert. Unsere Fibrillen sind jedoch mit 50-300 nm (gegenüber 100-500 nm) kürzer, was wahrscheinlich mit der wiederholten Ultraschallbehandlung während der Reinigung erklärt werden kann. Im Sucrosegradienten nimmt erwartungsgemäß die Länge der Fibrillen von oben nach unten zu und im Sediment formen die SAF dichte Aggregate.

Die hohe Reinigung der Infektiosität in den mittleren Fraktionen des Sucrose-Sedimentationslaufs auf 10^3 - 10^4 in Bezug auf Protein und die im Elektronenmikroskop dominierenden Fibrillen in Fraktionen hoher Infektiosität legen die Vermutung nahe, daß diese Fibrillen das infektiöse Agens darstellen. Das "schmieren" der Infektiosität im Sucrosegradienten wird damit ebenfalls erklärt.

Eine Beziehung zwischen Fibrillen und Infektiosität wurde auch in ungereinigten Hirnextrakten aus infizierten Hamstern (Agens-Stamm 263 K) und infizierten Mäusen (Agens-Stamm 139 A) gefunden: die Anzahl der SAF stieg im Verlauf der Infektion mit der Infektiosität (80).

Analysen von SAF-haltigen Fraktionen mit SDS-PAGE zeigen ein Protein von etwa 26000 Dalton, das in Kontrollfraktionen nicht vorkommt (siehe Abb. 16). Das Protein kann nicht in Untereinheiten dissoziiert werden und ist vermutlich der Hauptbestandteil der Fibrillen (SAF-Protein). Andere Untersuchungen zur Reinigung des Scrapie-Agens haben einen Zusammenhang zwischen Infektiosität und einem Protein von 27000-

30000 Dalton gezeigt (4a). Dieses Protein aggregiert zu amyloidähnlichen Strukturen (rods genannt), die 10-20 nm Durchmesser und 100-200 nm Länge aufweisen und aus ca. 1000 Untereinheiten bestehen sollen (100a). Die Untereinheiten (Prion-Protein) und das von uns gefundene 26000 Dalton Protein sowie die rods und die von P.Merz entdeckten SAF sind mit großer Wahrscheinlichkeit identisch.

Das SAF-Protein erscheint nach SDS-PAGE als breite, verschmierte Bande. Um die Homogenität dieses Proteins abzuklären, sind weitere Untersuchungen, wie z.B. isoelektrische Fokussierung oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie erforderlich.

In Abbildung 16 wird eine schnellere und effizientere Methode zur Anreicherung von SAF-Protein aus dem Sediment P_{215S} vorgestellt. Mit dieser Methode ist es möglich, gereinigtes SAF-Protein innerhalb von zwei Tagen zu isolieren. Für die Reinigung über Sucrosegradienten werden vier Tage benötigt und aus fünf Hamsterhirnen etwa 1 µg SAF-Protein gewonnen. Die vereinfachte Extraktionsmethode zeigt einen SAF-Proteingehalt von 200-400 ng in 0,05 Hirnäquivalenten, d.h. es werden 4-8 µg SAF pro Hirn isoliert. Die Proteingehalte wurden aus der Intensität der Gelfärbung im Vergleich zu Standardmengen Chymotrypsin A geschätzt. Bei der Pufferextraktion werden wieder SAF und Infektiosität in der gleichen Fraktion gefunden. Die Beobachtung, daß sich die gereinigte Scrapie-Infektiosität in einer Eppendorf-Zentrifugation bei nur 7000 g abzentrifugieren läßt, kann mit der hydrophoben Natur des Agens und seiner Tendenz zur Aggregation erklärt werden. Ein derartiges unkonventionelles Verhalten ist von keinem anderen Virus bekannt.

Die genaue spezifische Aktivität des letzten Sediments P(E)IV wird zur Zeit über Endpunkttitraktionen bestimmt.

Erste Ergebnisse aus diesen Experimenten lassen vermuten, daß die Infektiosität dieser Fraktionen gegenüber dem Ausgangsmaterial erhöht ist. Diese Befunde können mit einer Reinigung des infektiösen Materials von Inhibitoren erklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit zur Reinigung des Scrapie-Agens kann im partiell gereinigtem Sediment P_{215S} und allen weiter gereinigten Fraktionen das Auftreten von Fibrillen mit der Infektiosität korreliert werden. Für diese Befunde sind zwei Erklärungen denkbar:

Zum einen könnte der Erreger die Entstehung der Fibrillen als Teil des Krankheitsprozesses induzieren und zufällig mit ihnen gereinigt werden. Das Vorkommen von SAF ist eine konstant gefundene Beobachtung bei Scrapie und der ähnlichen Creutzfeldt-Jakob Erkrankung. Die SAF ähneln strukturell den in Gehirnen vorkommenden Amyloidfibrillen und cerebrale amyloide Plaques sind ein pathologischer Befund bei manchen Scrapie-Modellen. Wahrscheinlich werden innerhalb von Zellen die Fibrillen aus SAF-Protein gebildet und können manchmal in Form des cerebralen Amyloids außerhalb der Zellen abgelagert werden.

Die zweite Erklärung ist, daß die Fibrillen die infektiöse Form des Agens darstellen. Unterstützt wird diese Hypothese durch das gleichzeitige Auftreten von SAF in infizierten Milzen und Gehirnen. Die Fibrillen sind die einzige Struktur, die in gereinigten Fraktionen mit hoher Infektiosität gefunden worden sind. Obwohl bisher keine Scrapie-spezifische Nukleinsäure nachgewiesen werden konnte, ist es von der Größe der Fibrillen her durchaus denkbar, daß sie eine Nukleinsäure enthalten.

Um abzusichern, daß die SAF das infektiöse Agens darstellen, müssen mit weiteren Versuchen die biologischen Eigenschaften (z.B. Herstellen neutralisierender Antikörper, Suche nach

Nukleinsäure) und die chemische Struktur (Aminosäurezusammensetzung und -sequenz) aufgeklärt werden.

7. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Reinigung des unkonventionellen Erregers der chronisch-degenerativen Scrapie-Erkrankung aus Hamsterhirnen dargestellt. Die Charakterisierung des gereinigten Materials mit Sedimentationsanalyse, Elektrophorese und elektronenmikroskopischer Analyse wird beschrieben.

Mit Differentialzentrifugationen, Enzym- und Detergenzbehandlungen wird etwa eine 20-fache, 200-fache und 500-fache Anreicherung der Infektiosität in Bezug auf RNA, DNA und Protein erreicht.

Das gereinigte Agens sedimentiert im Sucrosegredienten größtenteils bei 70-300s und damit in einem Bereich, in dem auch kleine Viren sedimentieren. Die mit isopyknischer Gleichgewichtszentrifugation ermittelte Dichte liegt bei 1,35 g/ml, was weder eine nackte Nukleinsäure noch eine Lipidhülle des Erregers wahrscheinlich erscheinen läßt.

In gereinigten Fraktionen aus Scrapie-infizierten Hamsterhirnen werden Fibrillen gefunden, die in Kontrollmaterial fehlen. Die Fibrillen haben eine Länge von 50-300 nm und bestehen aus zwei helikal verdrehten Filamenten von je 4-6 nm Durchmesser.

Ein Hamsterhirn enthält wenigstens 4-8 µg dieser Scrapieassoziierten Fibrillen (SAF), wie durch die Bestimmung ihres Hauptbestandteils, eines Proteins von 26000 Dalton (SAF-Protein) nachgewiesen wird.

Nach Differential-, Sedimentations-, und Dichtegradientenzentrifugation werden in Fraktionen mit hohem Infektiosi-

tätstiter die meisten SAF gefunden. Diese Befunde, die Größe von SAF sowie der Aufbau aus einem Hauptprotein sprechen für die Hypothese, daß die Fibrillen den Erreger darstellen.

Da die Fibrillen gereinigt vorliegen und die Infektiosität mit den Fibrillen assoziiert ist, erscheint es möglich, den unkonventionellen Erreger mit konventionellen virologischen Methoden weiter zu untersuchen.

7. SUMMARY

This thesis describes the purification of the slow unconventional virus causing scrapie disease from hamster brains. Purified material is characterized by sedimentation analysis, electrophoresis and electron microscopic examination.

Using differential centrifugation, enzyme and detergent treatment about a 20-fold, 200-fold and 500-fold enrichment in scrapie infectivity with respect to RNA, DNA and protein has been achieved.

Purified infectivity sediments mainly in a range of 70-300s, a range which also includes small viruses. Isopycnic sedimentation to equilibrium yields in a density of 1,35 g/ml, thus excluding a naked nucleic acid or a lipid containing virus as the infective entity.

Purified fractions from scrapie-infected hamster brains reveal fibrils, which are absent from control materials. The fibrils, measuring 50-300 nm in length, consist of two helically twisted filaments, each 4-6 nm diameter.

One hamster brain contains at least 4-8 μ g of these scrapie associated fibrils (SAF), as estimated from the amount of its major constituent, a protein of about 26000 Dalton (SAF-protein).

SAF copurify with scrapie infectivity during differential centrifugation, rate zonal and isopycnic density gradient centrifugation. These copurifications, virus-like size of the SAF and the fact that SAF contain a single major protein provide strong support for the hypothesis that SAF are the scrapie agent.

The purification of the fibrils and the association of infectivity with the fibrils make it feasible to analyse the unconventional viruses by conventional virological methods.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Adams, D.H., and Caspary, E.A.: Nature of the scrapie virus. *Br.Med.J.* 3, 173 (1967)
- 2) Alistair, J.L., Millson, G.C., and Manning, E.J.: Can scrapie titres be calculated accurately from incubation periods? *J.gen.Virol.* 64, 971 (1983)
- 3) Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A., and Clarke, M.C.: The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys.Res.Comm.* 22, 278 (1966)
- 4) Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A., and Clarke, M.C.: Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 219, 764 (1967)
- 4a) Bolton, D.C., McKinley, M.P., and Prusiner, S.B.: Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218, 1309 (1982)
- 5) Bonin, O.: *Quantitativ-virologische Methodik*. G.Thieme Verlag, Stuttgart, S.183 (1973)
- 6) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72, 248 (1976)
- 7) Brotherston, J.G., Renwick, C.C., Stamp, J.T., Zlotnik, I., and Pattison, J.H.: Spread of scrapie by contact to goats and sheep. *J.Comp.Path.* 78, 9 (1968)
- 8) Brown, P., Rohwer, R.G., Moreau-Dubois, M.C., Green, E.M., and Gajdusek, D.C.: Use of the golden Syrian hamster in the study of scrapie virus. In: *Hamster immune responses in infectious and oncologic disease advances in experimental medicine and biology*. Hart, D.A., Stein-Streilein, J., Duncan, W.R., and Billingham, R.E. (eds), Vol.34, 365, Plenum Press, New York (1981)

- 9) Brown, P., Rohwer, R.G., Green, E.M., and Gajdusek, D.C.: The effect of chemicals, heat and histopathologic processing on high-infectivity hamster-adapted scrapie virus. In: *Virus non conventionnels et affections du système nerveux central*. Court, L.A. (ed), 156, Masson, Paris (1983)
- 10) Brown, P., Rohwer, R.G., Amyx, H.L., Gibbs, C.J.jr., and Gajdusek, D.C.: Laboratory and hospital disinfection of spongiform encephalopathy viruses. In: *Virus non conventionnels et affections du système nerveux central*. Court, L.A. (ed), 509, Masson, Paris (1983)
- 11) Bruce, M.E., Dickinson, A.G., and Fraser, G.: Cerebral amyloidosis in scrapie in the mouse: Effect of agent strain and mouse genotype. *Neuropath. and Appl. Neurobiol.* 2, 471 (1976)
- 12) Burton, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62, 315 (1956)
- 13) Chambers. J.A.A., and Rickwood, D.: Fractionation of subcellular organelles by differential centrifugation. In: *Practical centrifugation*, 33. Information Retrieval Ltd., London (1978)
- 14) Chandler, R.L.: Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* *i*, 1378 (1961)
- 15) Cho, H.J.: Requirement of a protein component for scrapie infectivity. *Intervirology* 14, 213 (1980)
- 16) Clarke, M.C.: The antibody response of scrapie-affected mice to immunisation with sheep red blood cells. *Res.Vet. Sci.* 9, 595 (1980)
- 17) Clarke, M.C., and Haig, D.A.: Evidence for the multiplication of the scrapie agent in cell culture. *Nature* 225, 100 (1970)

- 18) Cuillé, J., and Chelle, P.L.: Pathologie animale - La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? C.R.Acad.Sci., Paris 203, 1552 (1936)
- 19) Dickinson, A.G.: Scrapie in sheep and goats. In: Slow Virus Diseases of Animals and Man. Kimberlin, R.H. (ed), Ch. 10, 209. Elsevier, Amsterdam (1976)
- 20) Dickinson, A.G., Fraser, H., McConnell, I., and Outram, G.W.: Mitogenic stimulation of the host enhances susceptibility to scrapie. Nature 272, 54 (1978)
- 21) Dickinson, A.G., Bruce, M.E., and Scott, J.R.: The relevance of scrapie as an experimental model for Alzheimer's Disease, In: Biological Aspects of Alzheimer's Disease, Banbury Report 15, 387. Katzman, R. (ed), Cold Spring Harbor (1983)
- 22) Diener, T.O.: Is the scrapie agent a viroid? Nature New Biology 235, 218 (1972)
- 23) Diener, T.O., McKinley, M.P., and Prusiner, S.B.: Viroids and prions. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 5220 (1982)
- 24) Diringier, H., and Kimberlin, R.H.: Infectious scrapie agent is apparently not as small as recent claims suggest. Biosci.Rep. 3, 563 (1983)
- 25) Diringier, H.: Sustained viremia in experimental hamster scrapie. Arch.Virol. (1984) in press
- 26) Dulbecco, R., and Vogt, M.: Plaque formation and isolation of pure cell lines with polomyelitis viruses. J.Exp. Med. 99, 167 (1954)
- 27) Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H.O., and Lang, H.: Proteinase K from Tritirachium album limber. Eur.J.Biochem. 47, 91 (1974)
- 28) Ehlers, B., Rudolf, R., and Diringier, H.: The reticulo-endothelial system in scrapie pathogenesis. J.gen.Virol. 65, 423 (1984)
- 29) Ehlers, B., and Diringier, H.: Dextran sulphate 500 delays and prevents mouse scrapie by impairment of agent replication in spleen. J.gen.Virol. 65, (1984) in press

- 30) Eklund, C.M., Kennedy, R.C., and Hadlow, W.J.: Pathogenesis of the scrapie agent and its behavior in mice. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 112, 974 (1963)
- 31) Eklund, C.M., Kennedy, R.C., and Hadlow, W.J.: Pathogenesis of the scrapie virus infection in the mouse. *J.Infect.Dis.* 117, 15 (1967)
- 32) Fahrney, D.E., and Gold, A.M.: Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. I. Rates of reaction with acetylcholinesterase, α -chymotrypsin, and trypsin. *J.Am.Chem. Soc.* 85, 997 (1963)
- 33) Field, E.J.: Transmission experiments with multiple sclerosis: An interim report. *Br.Med.J.* 2, 564 (1966)
- 34) Field, E.J., Farmer, F., Caspary, E.A., and Joyce, G.: Susceptibility of scrapie agent to ionizing radiation. *Nature* 222, 90 (1969)
- 35) Field, E.J., and Shenton, B.K.: Scrapie-like antigen(s) in ageing tissues. *Nature* 244, 174 (1973)
- 36) Field, E.J.: Immunological assessment of ageing: Emergence of scrapie-like antigens. *Age and Ageing* 7, 28 (1978)
- 37) Franklin, C.E., and Zucker-Franklin, D.: Current concepts of amyloid. In: *Advances in Immunology* 15, 249 (1972)
- 38) Fraser, H., and Dickinson, A.G.: Pathogenesis of scrapie in the mouse: The role of the spleen. *Nature* 226, 462 (1970)
- 39) Fraser, H., and Bruce, M.: Argyrophilic plaques in mice inoculated with scrapie from particular sources. *Lancet* i, 617 (1973)
- 40) Fraser, H.: The pathology of natural and experimental scrapie. In: *Slow Virus Diseases of Animals and Man*. Kimberlin, R.H. (ed), Ch. 12, 276. Elsevier, Amsterdam (1976)

- 41) Fraser, H.: The pathogenesis and pathology of scrapie. ARC Animal Breeding, Research Organisation, King's Buildings, West Mains Road, Edinburgh, EH9 3JQ (1979)
- 42) Fraser, H.: Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway. *Nature* 295, 149 (1982)
- 43) Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J.Jr., and Alpers, M.: Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209, 794 (1966)
- 44) Gajdusek, D.C.: Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 197, 943 (1977)
- 45) Gelderblom, H., Bauer, H., Frank, H., and Wigand, R.J.: The structure of group II adenoviruses. *J.gen:Virol.* 1, 553 (1967)
- 46) Gibbs, C.J.Jr.: Search for infectious etiology in chronic and subacute degenerative diseases of the central nervous system. In: Current Topics in Microbiology and Immunology. Brody, J.A., Henle, W., and Koprowski, H. (eds). Vol. 40, 44, Springer-Verlag, Berlin (1967)
- 47) Gibbs, C.J.Jr., Gajdusek, D.C., Asher, D.M., and Alpers, M.P.: Creutzfeldt-Jakob-disease (spongiform encephalopathy): Transmission to the chimpanzee. *Science* 161, 388 (1968)
- 48) Gibbs, C.J.Jr., and Gajdusek, D.C.: Experimental subacute spongiform virus encephalopathies in primates and other laboratory animals. *Science* 182, 67 (1973)
- 49) Gibbs, C.J.Jr., and Gajdusek, D.C.: Atypical viruses as the cause of sporadic, epidemic, and familial chronic diseases in man: Slow viruses and human diseases. In: Perspectives in Virology, 10, Ch. 11, 177 (1978)
- 50) Glenner, G.G., Eanes, E.D., Bladen, H.A., Linke, R.P., and Termine, J.D.: β -pleated sheet fibrils. A comparison of native amyloid with synthetic protein fibrils. *J.Histochem. Cytochem.* 22, 1141 (1974)

- 51) Glenner, G.G.: Alzheimer's disease: multiple cerebral amyloidosis. In: Biological Aspects of Alzheimer's Disease, Banbury Report 15, 137. Katzman, R. (ed), Cold Spring Harbor (1983)
- 52) Gonenne, A., and Ernst, R.: Solubilization of membrane proteins by sulfobetaines, novel zwitterionic surfactants. Anal. Biochem. 87, 28 (1978)
- 53) Goudsmit, J., Rohwer, R.G., Silbergeld, E.K., Neckers, L.M., and Gajdusek, D.C.: Scrapie in hamsters: clinical disease and disturbances in the serotonergic pathway. In: Virus non conventionnels et affections du système nerveux central, 453. Court, L.A. (ed), Masson, Paris (1983)
- 54) Hadlow, W.J.: Scrapie and kuru. Lancet ii, 289 (1959)
- 55) Hartsough, G.R., and Burger, D.: Encephalopathy of mink. I. Epizootic and clinical observations. J.Infect. Dis. 115, 387 (1965)
- 56) Heins, J.N., Suriano, J.R., Taniuchi, H., and Anfinsen, C.B.: Characterization of a nuclease produced by Staphylococcus aureus. J.Biol.Chem. 242, 1016 (1967)
- 57) Helenius, A., McCaslin, D.R., Fries, E., and Tanford, C.: Properties of detergents. Methods Enzymol. 56, 734 (1979)
- 58) Hunter, G.D.: Scrapie: A prototype slow infection. J.Infect, Dis. 125, 427 (1972)
- 59) James, G.T.: Inactivation of the protease inhibitor phenylmethanesulfonylfluoride in buffers. Anal.Biochem. 86, 574 (1978)
- 60) Kasper, G.C., Bowman, K., Stites, D.P., Prusiner, S.B.: Towards development of assays for scrapie-specific antibodies. Adv.Exp.Med.Biol. 134, 401 (1981)
- 61) Kimberlin, R.H.: General introduction to some slow virus diseases. In: Slow Virus Diseases of Animals and Man, Ch. 1, 3. Elsevier, Amsterdam (1976)

- 62) Kimberlin, R.H.: Experimental scrapie in the mouse: A review on a important model disease. Science Progress, Oxford, 63, 461 (1976)
- 63) Kimberlin, R.H., and Walker, C.A.: Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. J.gen.Virol. 34, 295 (1977)
- 64) Kimberlin, R.H., and Walker, C.A.: Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. J.gen.Virol. 39, 487 (1978)
- 65) Kimberlin, R.H., and Walker, C.A.: Pathogenesis of mouse scrapie: effect of route of inoculation on infectivity titres and dose-reponse curves. J.Comp.Pathol. 88, 39 (1978)
- 66) Kimberlin, R.H., and Walker, C.A.: Pathogenesis of mouse scrapie: dynamics of agent replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes. J.Comp.Pathol. 89, 551 (1979)
- 67) Kimberlin, R.H., and Walker, C.A.: Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS. J.gen.Virol. 51, 183 (1980)
- 68) Kimberlin, R.H., Field H.J., and Walker, C.A.: Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system. J.gen.Virol. 64, 713 (1983)
- 69) Kimberlin, R.H., Hall, S.M., and Walker, C.A.: Pathogenesis of mouse scrapie. Evidence for direct neural spread of infection to the CNS after injection of sciatic nerve. J.Neurolog.Sciences, 61, 315 (1983)
- 70) Kingsbury, D.T., Kasper, K.C., Stites, D.P., Watson, J.D., Hogan, R.N., and Prusiner, S.B.: Genetic control of Scrapie and Creutzfeld-Jakob disease in mice. J.Immunol. 131, 491 (1983)

- 71) Laemmli, U.K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 (1970)
- 72) Latarjet, R., Muel, B., Haig, D.A., Clarke, M.C., and Alper, T.: Inactivation of the scrapie agent by near monochromatic ultraviolet light. *Nature* 227, 1341 (1970)
- 73) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.C., and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193, 265 (1951)
- 74) Malone, T.G., Marsh, R.F., Hanson, R.P., and Semancik, J.S.: Evidence for the low molecular weight nature of scrapie agent. *Nature* 278, 375 (1979)
- 75) Marsh, R.F., and Kimberlin, R.H.: Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology and pathogenesis. *J.Infect. Dis.* 131, 104 (1975)
- 76) Marsh, R.F., and Hanson, R.P.: The Syrian hamster as a model for the study of slow virus diseases caused by unconventional agents. *Fed. Proc.* 37, 2076 (1977)
- 77) Marsh, R.F., Malone, T.G., and Semancik, J.S.; Lancaster, W.D., and Hanson, R.P.: Evidence for an essential DNA component in the scrapie agent. *Nature* 275, 146, (1978)
- 78) Mejbaum, W.: Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere in Derivaten der Adenylsäure. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Che.* 258, 117 (1939)
- 79) Merz, P.A., Somerville, R.A., and Wisniewski, H.M.: Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta neuropathol.(Berl.)* 54, 63 (1981)
- 80) Merz, P.A., Somerville, R.A., and Wisniewski, H.M.: Abnormal fibrils in scrapie and senile dementia of Alzheimer type. In: *Virus non coventionnels et affections du système nerveux central*, 259. Court, L.A. (ed), Masson, Paris (1983)

- 81) Merz, P.A., Somerville, R.A., Wisniewski, H.M., Manuelidis, L., and Manuelidis, E.E.: Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 306, 474 (1983)
- 82) Millson, G.C., Hunter, G.D., and Kimberlin, R.H.: An experimental examination of the scrapie agent in cell membrane mixtures. II. The association of scrapie activity with membrane fractions. *J.Compar.Pathol.* 81, 255 (1971)
- 83) Millson, G.C., Hunter, G.D., and Kimberlin, R.H.: The physico-chemical nature of the scrapie agent. In: *Slow Virus Diseases of Animals and Man*. Kimberlin, R.H. (ed), Ch.11, 243. Elsevier, Amsterdam (1976)
- 84) Millson, G.C., and Manning, E.J.: The effect of selected detergents on scrapie infectivity. In: *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*, Vol.2, 409. Prusiner, S.B., and Hadlow, W.J. (eds) Academic Press, New York (1979)
- 85) Mould, D.L., Dawson, A.M., and Rennie, J.C.: Very early replication of scrapie in lymphocytic tissue. *Nature* 228, 779 (1970)
- 86) Munro, H.N., and Fleck, A.: The determination of nucleic acids. *Methods Biochem.Anal.* 14, 113 (1966)
- 87) Oakley, B.R., Kirsch, D.R., and Morris, N.R.: A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal.Biochem.* 105, 361 (1980)
- 88) Orth, D.H.: Proteinase K - eine neue Methode zur Isolierung hochmolekularer Nukleinsäuren. *Kontakte* 3, 35, E. Merck, Darmstadt (1976)
- 89) Outram, G.W., Dickinson, A.G., and Fraser, H.: Reduced susceptibility to scrapie in mice after steroid administration. *Nature*, 249, 855 (1974)
- 90) Outram, G.W.: The pathogenesis of scrapie in mice. In: *Slow Virus Diseases of Animals and Man*, Ch.14, 325. Kimberlin, R.H. (ed), Elsevier, Amsterdam (1976)

- 91) Pattison, I.H., Hoare, M.N., Jebbett, J.N., and Watson, W.A.: Spread of Scrapie from sheep and goats by oral dosing with fetal membranes from scrapie affected sheep. *Vet.Rec.* 90, 465 (1972)
- 92) Pattison, J.H.: Scrapie in sheep selectively bred for high susceptibility. *Nature* 248, 594 (1974)
- 93) Poehling, H.-M., and Neuhoff, V.: Visualization of proteins with a silver "stain": A critical analysis. *Electrophoresis* 2, 141 (1981)
- 94) Porter, D.D., Porter, H.G., and Cox, N.A.: Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. *J.Immunol.* 111, 1407 (1973)
- 95) Prusiner, S.B., Hadlow, W.J., Garfin, D.E., Cochran, S.P., Baringer, J.R., Race, R.E., and Eklund, C.M.: Partial purification and evidence for multiple molecular forms of the scrapie agent. *Biochem.* 17, 4993 (1978)
- 96) Prusiner, S.B., Groth, D.F., Bildstein, C., Maslarsz, F.R., McKinley, M.P., and Cochran, S.P.: Electrophoretic properties of the scrapie agent in agarose gels. *Proc. Natl.Acad.Sci.USA* 77, 2984 (1980)
- 97) Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Groth, D.F., Bowman, K.A., Mock, N.J., Cochran, S.P., and Maslarsz, F.R.: Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* 78, 6675 (1981)
- 98) Prusiner, S.B., Bolton, D.C., Groth, D.F., Bowman, K.A., Cochran, S.P., and McKinley, M.P.: Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 21, 6942 (1982)
- 99) Prusiner, S.B., Cochran, S.P., Groth, D.F., Downey, D.E., Bowman, K.A., and Martinez, H.M.: Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann.Neurol.* 11, 353 (1982)

- 100) Prusiner, S.B.: Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136 (1982)
- 100a) Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Bolton, D.C., Bendheim, P.E., Groth, D.F., and Glenner, G.G.: Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35, 349 (1983)
- 101) Rohwer, R.G., Brown, P.W., and Gajdusek, D.C.: The use of sedimentation to equilibrium as a step in the purification of the scrapie agent. In: *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*, Vol.2, 465 (Prusiner, S.B., and Hadlow, W.J., eds.) Academic Press, New York (1979)
- 102) Rohwer, R.G., and Gajdusek, D.C.: Scrapie - Virus or Viroid - The case for a virus. In: *Search for the Cause of Multiple Sclerosis and Other Chronic Diseases of the Central Nervous System* (A. Boese, ed.) Verlag Chemie, Weinheim 333 (1980)
- 103) Rohwer, R.G.: Scrapie infectious agent is virus-like in size and susceptibility to inactivation. *Nature* 308, 658 (1984)
- 104) Rohwer, R.G.: Virus-like sensitivity of the scrapie agent to heat inactivation. *Science* 223, 600 (1984)
- 105) Schneider, W.C.: Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. *Methods Enzymol.* 3, 680 (1957)
- 106) Schulze, P.: Traberkrankheit der Schafe (Scrapie). In: *Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren*. Heinz Röhrer (Herausgeber), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, Bd. IV, spezieller Teil 3 (1969)
- 107) Semancik, J.S., Marsh, R.F., Geelen, J.L.M.C., and Hanson, R.P.: Properties of the scrapie agent-endomembrane complex from hamster brain. *J.Virol.* 18, 693 (1976)

- 108) Shepherd, G.R., Hopkins, P.A.: Determination of protein contamination of deoxyribonucleic acid by the Folin-Lowry method. *Anal.Chem.* 35, 1548 (1963)
- 109) Sigurdsson, B.: Rida, a chronic encephalitis of sheep. *Brit.vet.J.* 110, 341 (1951)
- 110) Stamp, J.T.: Scrapie: A transmissible disease of sheep. *Vet.Rec.* 74, 357 (1962)
- 111) Szybalsky, W., and Szybalski, E.H.: Equilibration density gradient centrifugation. In: *Procedures in Nucleic Acid Research*, Vol.2, 310 (1971)
- 112) Fischer, I., Gelderblom, H., Vettermann, W., and Koch, M.A.: A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295, 64 (1982)
- 113) Tucker, P.W., Hazen, E.J.Jr., and Cotton, F.A.: Staphylococcal nuclease reviewed: A prototypic study in contemporary enzymology. I. Isolation; physical and enzymatic properties. *Molecular and Cellular Biochemistry* 22, 67 (1978)
- 114) Wisniewski, H.M., Bruce, M.E., and Fraser, H.: Infectious etiology of neuritic (senile) plaques in mice. *Science* 190, 1108 (1975)
- 115) Wiesniewski, H.M., and Merz, G.S.: Neuritic and amyloid plaques in senile dementia of the Alzheimer type. In: *Biological Aspects of Alzheimer's Disease*, Banbury Report 15, 145. Katzman, R. (ed), Cold Spring Harbor (1983)
- 116) Zlotnik, I., and Rennie, J.L.: Experimental transmission of mouse passaged scrapie to goats, sheep, rats and hamsters. *J.Comp.Pathol.* 75, 147 (1965)

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.Diringer für die Überlassung des Themas und die intensive und effektive Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. H.Gelderblom und Herrn Dr. M.Özel danke ich für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Weiter möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Fachgebiets Chronisch-degenerative Viruserkrankungen des Robert Koch-Institutes und Frau A.Passow für ihre Hilfe und tatkräftige Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. E.-R.Lochmann, Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Freien Universität Berlin gilt mein Dank für die Betreuung dieser Arbeit seitens der Universität.

LEBENS LAUF

Name:	Horst Hilmert
geb.:	07.05.1953 in Detmold
Eltern:	Helmut Hilmert Martha Hilmert, geb. Boberg
1960 - 1964	Besuch der Grundschule in Detmold
1964 - 1972	Besuch des Gymnasiums in Detmold
15.05.1972	Abitur
1972 - 1973	Zivildienst im Kreiskrankenhaus Detmold
1973 - 1975	Krankenpflegedienst im Kreiskrankenhaus Detmold
1975 - 1976	Studium der Lebensmitteltechnologie an der Technischen Universität Berlin
SS 1976	Studienbeginn am Fachbereich Biologie der Freien Universität Berlin
14.07.1978	Vordiplom
21.04.1982	Diplom
Mai 1982	Beginn der Dissertation im Fachgebiet Chronisch-degenerative Viruserkrankun- gen des Robert Koch-Instituts unter Anleitung von Prof. Dr. H.Diringer

